

福 岡 大 学 博 士 学 位 論 文

The abnormal senescence of astrocytes induced
by amyloid β protein fragment 1-40

β アミロイドによるアストロサイトの異常老化に関する研究

平成 25 年度 3 月

目次

諸言	1
第1章 培養アストロサイトにおける amyloid β protein fragment 1-40 ($A\beta_{1-40}$, 0.5 μ M) 72 時間慢性暴露による細胞老化促進作用	5
第1節 老化型アストロサイトの定性と特性	
1-1 β -galactosidase 染色法（老化細胞染色法）を用いた老化型アストロサイトの定性	
1 実験材料ならびに実験方法	
1-1 実験動物	
1-2 実験方法	
1-2-1 アストロサイト初代培養標本の作製手順	
1-2-2 $A\beta_{1-40}$ の調整と培養アストロサイトへの投与手順	
1-2-3 β -galactosidase 染色法を用いた老化細胞の定性および老化細胞数の定量	
1-2-4 Nuclear Factor-Kappa B (NF- κ B) 染色法を用いた炎症反応の定性	
1-2-5 統計処理	
2 実験結果	11
2-1 $A\beta_{1-40}$ を慢性暴露したアストロサイトにおける β -galactosidase 活性の定量	
2-2 $A\beta_{1-40}$ の慢性暴露による炎症反応の誘導に関する検討	
3 考察	13

第2章 長期培養による自然老化型アストロサイトを用いた、ニューロンの興奮性シナプス伝達の低下作用	14
第1節 アストロサイトの自然老化に基づくシナプス修飾作用の解析	15
1 実験材料ならびに実験方法	
1-1 実験動物	
1-2 実験方法	
1-2-1 オータプス培養標本の作製手順	
1-2-2 ホールセルパッチクランプ法を用いたシナプス解析	
1-2-3 vGlut1, MAP2 染色によるニューロン形態およびシナプス形成の解析	
1-2-4 FM1-43FX 染色によるアクティブシナプスおよびサイレントシナプスの解析	
1-2-5 統計処理	
2 実験結果	24
2-1 老化型アストロサイトによるシナプス機能修飾作用に関する電気生理学的解析	
2-2 老化型アストロサイトによるシナプス形成に関する組織免疫学的解析	
2-3 老化型アストロサイトによる興奮性シナプス伝達低下のメカニズムに関する検討	
2-3-1 サイレントシナプスの発現率に関する検討	
2-3-2 興奮性シナプスの発達過程におけるシナプス伝達様式の変化に関する検討	
3 考察	38

第3章 $A\beta_{1-40}$ 慢性暴露による興奮性シナプス伝達の低下作用・・・・・・・・・・ 40

第1節 オータプス培養標本に $0.5 \mu\text{M}$ $A\beta_{1-40}$ を慢性暴露すると興奮性シナプス伝達が低下した

1 実験材料ならびに実験方法

1-1 実験動物

1-2 実験方法

1-2-1 オータプス培養標本の作製手順

1-2-2 ホールセルパッチクランプ法を用いたシナプス解析

1-2-3 vGluT1, MAP2 染色によるニューロン形態およびシナプス形成の解析

1-3 統計処理

2 実験結果

2-1 $A\beta_{1-40}$ 慢性暴露によるニューロン-アストロサイト相互作用に基づく興奮性シナプス伝達修飾作用に関する検討

2-2 興奮性シナプスの形態に対する $A\beta_{1-40}$ の影響に関する検討

第2節 $0.5 \mu\text{M}$ $A\beta_{1-40}$ 慢性暴露による異常老化アストロサイトと共培養したニューロンにおける興奮性シナプス伝達の低下作用・・・・・・・・・・ 46

1 実験材料ならびに実験方法

1-1 実験動物

1-2 実験方法

1-2-1 β -galactosidase 染色法による老化細胞の定性

1-2-2 オータプス培養標本の作製手順

1-2-3 ホールセルパッチクランプ法を用いたシナプス解析

1-3 統計処理

2 実験結果

2-1 $A\beta_{1-40}$ 慢性暴露により老化が促進したアストロサイトにおける $A\beta_{1-40}$ 除去後の
老化維持に関する検討

2-2 異常老化したアストロサイトと共培養したニューロンの興奮性シナプス伝達修飾
作用に関する検討

3 考察・・・54

総括ならびに結論・・・56

参考文献・・・59

謝辞・・・74

諸言

脳は神経細胞とグリア細胞、血管から構成されており、ヒトの脳においてグリア細胞は脳細胞の約半数を占めている^{1, 2, 3)}。グリア細胞の一種であり、脳細胞の中で最も数が多いアストロサイトは、ニューロンの構造的な支持、ニューロンへの栄養供給、過剰放出された伝達物質の除去など、ニューロンを保護する役割のみならず^{4, 5, 6, 7)}、近年の研究では、アストロサイト同士がギャップ結合を形成し、物理的な細胞間連絡を行ったり^{8, 9)}、シナプス形成や樹状突起の伸長を制御したり^{10, 11, 12)}、細胞内 Ca^{2+} 濃度を変動させることで神経伝達を制御したりする役割を担っていることが明らかとなってきた^{13, 14, 15, 16, 17)}。*in vitro* 研究においても、ニューロンをアストロサイトと共培養することでシナプス形成が促進し、シナプス伝達が増加することも報告されている^{18, 19, 20)}。

また、これまでは神経細胞の変性が原因であると考えられてきたアルツハイマー病やレット症候群などの神経変性疾患においても、その発症や進行の制御にアストロサイトの病態が関わっている可能性が示唆されている^{21, 22, 23)}。しかし、アストロサイトのシナプス伝達制御機能に関しては未知な部分が多く、アストロサイトによる脳機能の構築に対する役割はいまだ明らかになっていない。

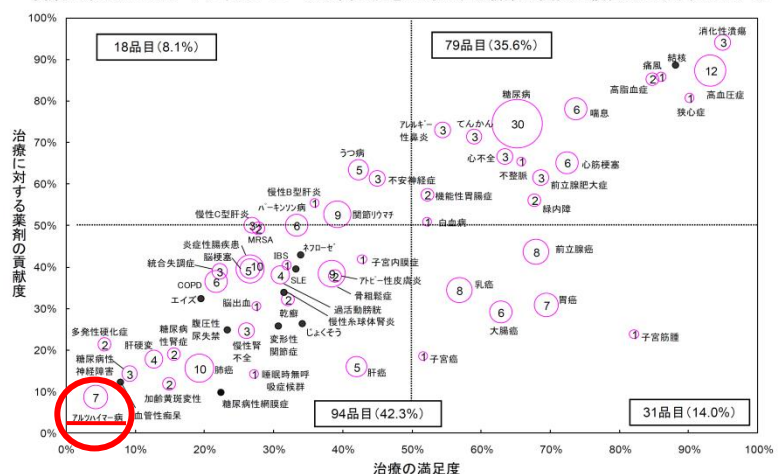
本研究は、アルツハイマー病とアストロサイトの老化の因果関係に着目している。アルツハイマー病患者数は高齢者人口の増加に伴い増加の一途をたどっており、日本国内では150万人を超えている。このような現状にも関わらず、アルツハイマー病の治療法開発が進まない大きな原因は（図 医薬産業政策研究所，2009）、アルツハイマー病発症機序には未知な部分が多く、未だに様々な説が議論されており、病態の詳細な解明に至っていない。

進行性の記憶障害、失語・失認などの認知機能障害を呈する中核症状と、妄想、うつ症状、不安などの多彩な神経症状を呈する周辺症状が頻繁に認められ、また、組織学的特徴として、脳萎縮、老人斑、神経原線維変化などが確認されている。アルツハイ

マー病の発症メカニズムに関しては、アミロイドカスケード仮説^{24, 25, 25)}、コリン仮説^{27, 28)}、タウ仮説^{29, 30, 31)}などが挙げられる。

治療満足度(2005年)別にみた新薬の開発状況(2009年5月時点)

～製薬企業はアンメット・メディカル・ニーズの高い疾患に対応する新薬の開発に積極的に取り組んでいる～



これらの説に基づいて、アルツハイマー病のバイオマーカーとして、脳脊髄液中 A β 、総タウ、p-タウなどが研究されており、これまでに数多くの報告がされている（表 1 神経精神学会 AD 治療ガイドライン 2010）。2001 年に発表された米国神経学アカデミーによるアルツハイマー型認知症診断のバイオマーカーである、脳

研究報告	年	対象	バイオマーカー	感度	特異性	その他
Kanai	1998	93AD, 54cont, 33nAD, 56ND	A β 40, A β 42, tTau	71~91%	83%	multicenter, prospective (GTT)
Hulst	1999	150AD, 100cont, 79nAD, 84ND	A β 42, tTau	85%	86%	Europe 10 center
Knopman	2001	3 class II, III 研究	A β 42, tTau	80~97%	86~95%	systematic review ANN
Andreasean	2001	163AD, 23VaD, 20MCL, 9DLB, 8ND	A β 42, tTau	75~94%	89~100%	1y-prospective
Itoh	2001	236AD, 239nAD/ND, 95cont	pTau199	85%	85%	multicenter
Shoji	2002	366AD, 181cont, 168nAD, 316ND	tTau	59%	90%	multicenter
Clark	2003	106dementia, 73cont	A β 42, tTau	85%	84%	2~8y follow autopsy confirmed
Sunderland	2003	17A β 42研究, 34tau研究 (3,133AD vs 1,481cont)	A β 42, tTau	85%	89%	meta-analysis
Blenow	2003	41tau研究 (2,500AD vs 1,400cont)	A β 42	86%	90%	systematic review early
		15A β 42研究 (600AD vs 450cont)	tTau	90%	81%	AD, MCL
		11p-Tau研究 (800AD vs 370cont)	pTau	92%	80%	
			A β 42/tTau	85~94%	83~100%	
Hampel	2004	161AD/FAD/DLB/VaD, 45cont	pTau231	85%	83%	international
			pTau181		79%	harmonization
			pTau199		60~71%	
GTT3	2004	243AD, 91cont, 152nAD, 157ND	A β 40, A β 42, tTau	80%	84%	continuous GTT1

AD=Alzheimer病, cont=対照, nAD=非AD型認知症, ND=認知症を伴わない神経疾患, tTau=総タウ, pTau=リン酸化タウ

脊髄液中 A β の低下と総タウ値の上昇を基準とした診断においては、実践的指針で感度 85%、特異度 87%と評価され、ガイドラインとして推奨された。このように、アミロイドカスケード仮説、タウ仮説を擁護する報告が数多くあるが、その中でもアミロイドカスケード仮説を擁護し、A β が主要原因物質であるとの主張が大半である³²⁾。

近年、アルツハイマー病においてはアミロイドカスケード仮説を根拠とする組織学的特徴、病理学的特徴の多くが明らかとなりつつあるが、数年前までは、これら 2 つの特徴を結びつける根拠が乏しかった。例えば、アルツハイマー病患者の特徴とされている A β の蓄積量が認知機能障害や神経脱落の程度と一致しないこと、認知機能の障害が認められなかった高齢者の解剖脳に、アルツハイマー病患者脳に相当する A β の蓄積がしばしば認められること、また、アルツハイマー病モデル動物で検出された遺伝子変異を導入させたトランスジェニックマウスの脳においては、A β が高度に蓄積しているにもかかわらず、有意な神経細胞の脱落が認められないことなどが報告されている³³⁾。このように、多くのアルツハイマー病関連の研究の根拠とされているアミロイドカスケード仮説が疑問視される報告があったが、近年、アミロイド・イメージングにより、脳内の A β 蓄積の可視化が可能となり、また functional MRI の発達により、微細な脳機能の画像化が可能となったことで、アミロイドカスケード仮説を支持する報告が増えてきている。A β の蓄積には領域選択性があり、これらの領域が担う記憶形成に関わる機能が、A β 蓄積に伴い障害されていることが functional MRI により明らかとなった^{34,35)}。また、アミロイド・イメージング陽性領域は脳脊髄液中の A β の減少と相関することも報告されており³⁶⁾、アルツハイマー病における A β 蓄積の病的意義がさらに重要視されることとなった。

本研究は、アミロイドカスケード仮説を支持する立場で研究を行っており、*in vitro* 実験において、A β がシナプス伝達に及ぼす作用の解析を試みたものである。A β は 40-42 のアミノ酸からなるペプチドであり、 β -及び γ -セクレターゼの働きにより前駆体タンパク (APP; amyloid β protein precursor) から産生される (図 1 J. Steven, *et al.*, 2005)。

γ -セクレターゼは APP の 40 もしくは 42 番目のアミノ酸を切断し、 $A\beta_{1-40}$ もしくは $A\beta_{1-42}$ を産生する。両者は性質が異なり、 $A\beta_{1-42}$ は凝集性が高く Senile Plaque（老人斑）とよばれるアミロイド凝集体に多く存在し、*in vitro* 実験においてもアルツハイマー病の病理過程で先行して凝集が生じることが認められている。APP 変異を有する遺伝子改変動物（Tg2576）を用いた実験では、 β -セクレターゼによる $A\beta$ 産生過程において、特に $A\beta_{1-42}$ 産生を増加させることが報告されている^{37, 38)}。 $A\beta$ の産生に関わる重要な因子には、APP、 β -及び γ -セクレターゼ以外にもプレセニリン（PS）があり、PS 変異を有する遺伝子改変動物では、 γ -セクレターゼによる APP 切断において、正常脳では産生が少ない $A\beta_{1-42}$ の産生を増加する方向にシフトする変異が認められた^{39, 40, 41)}。これらの遺伝子改変動物に共通する組織学的特徴は、 $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ の比率の増加により Senile plaque の凝集・蓄積を促進することであり、この Senile plaque が神経細胞死を誘導することでアルツハイマー病が発症すると考えられている^{42, 43, 44, 45)}。

しかし、近年の研究では、 $A\beta$ の凝集体である Fibril 体だけではなく、球状の低分子重合体である oligomer 体がアルツハイマー病による神経細胞障害に深く関わっていることが明らかとなった。記憶形成に関わる海馬神経細胞において oligomer 体がシナプス伝達低下作用を有することが報告されている^{46, 47, 48)}。例えば、 $A\beta$ oligomer はシナプス前細胞の active zone におけるシナプス小胞サイズや総数、伝達物質放出確率を低下させることでシナプス伝達を脆弱化するという報告や^{49, 50)}、リアノジン受容体や IP_3 受容体に作用し、細胞内 Ca^{2+} の調節機能を破綻させることによるシナプス伝達低下作用^{17, 51, 52)}、また、NMDA 受容体の活性化によりグルタミン酸の過剰放出誘導を介したシナプス脆弱作用を有することも知られている^{53, 54, 55)}。さらに、これらの作用機序はシナプス可塑性に関わる Long-term potentiation (LTP) の抑制に働くことも報告されている^{56, 57, 58)}。しかし、これらの機序は $A\beta$ の重合度や $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ 比率^{59, 60, 61)}、また、細胞外濃度により異なること^{47, 62, 63)}、また、アルツハイマー病発症の進行度によっても異なること^{38, 50, 64, 65)} が報告されており、アルツハイマー病における $A\beta$ のシナプス機能修飾作用に関する詳細な機序は不明である。

アルツハイマー病における $A\beta$ の詳細なメカニズムの解明を困難にしている要因はそれだけではない。 $A\beta$ には神経細胞障害だけではなく、アストロサイトやミクログリアなどのグリア細胞にまで作用を及ぼし、これらの作用もアルツハイマー病における神経ネットワークの破綻に関与していることが明らかとなってきた。正常な脳内では、アストロサイトやミクログリアは $A\beta$ 除去能を持ち、神経細胞保護的に働くが、 $A\beta$ による炎症反応に対して過剰に反応し、本来の神経保護作用が破綻することで、神経障害を誘発する可能性が示唆されている^{66, 67, 68, 69, 70, 71)}。また、 $A\beta$ の作用により、アストロサイトが有するシナプス間隙のグルタミン酸回収能が高まることで、興奮性シナプス伝達を低下させること^{72, 73)}、NMDA 受容体を活性化させ、アストロサイトからのグルタミン酸過剰放出誘導をによるシナプス伝達の脆弱⁷⁴⁾ などといった、ニューロン-グリア細胞相互作用に関する報告も増えてきている。

さらに、 $A\beta$ には細胞老化促進作用があることも明らかとなっており⁷⁵⁾、特に高齢者で顕著な脳機能障害を呈するアルツハイマー病と密接な関わりがあると考え、本研究テーマを設定した。本研究で用いた培養細胞では、アストロサイトのマーカーである glial fibrillary acidic protein (GFAP) の発現は認められたが、ミクログリアのマーカーである CD11b の発現はほとんど認められなかったことから (data not shown)、ミクログリアよりもアストロサイトがシナプス伝達に及ぼす影響の方が大きいと考え、ニューロン-老化アストロサイト相互作用の研究を中心に行った。第1章では、0.5 μM $A\beta_{1-40}$ による老化促進作用の有無を検討し、さらに、炎症関連マーカーによる検討を行い、その老化の特性を調べた。第2章では、時系列に従った老化アストロサイトのシナプス機能修飾作用を電気生理学的解析、免疫組織学的解析を用いて検討した。さらに、第3章では、 $A\beta_{1-40}$ による異常老化アストロサイトのシナプス機能修飾作用の解析、また、その作用がニューロンへの直接作用であるのか、それとも、アストロサイトを介した間接的な作用も有するのかを検討した。

第1章 培養アストロサイトにおける amyloid β protein fragment 1-40 ($A\beta_{1-40}$, 0.5 μM) 72 時間慢性暴露による細胞老化促進作用

アルツハイマー病の原因物質の1つと考えられている $A\beta$ は、アルツハイマー病患者の脳内に凝集・蓄積していることが確認されている。近年の研究において、培養アストロサイトに高濃度の $A\beta$ を慢性暴露すると、細胞老化が促進することが報告された⁷⁵⁾。本章では、脳内での産生量が最も多く、また、*in vitro* において単回投与でシナプス伝達の低下を誘導することが報告されている $A\beta_{1-40}$ (0.5 μM) での老化促進の有無を検討した⁴⁷⁾。

1-1 β -galactosidase 染色法（老化細胞染色法）によるアストロサイトの老化の定性

1 実験材料ならびに実験方法

1-1 実験動物

実験動物は、ICR 系統マウス生後 0～2 日（九動）を初代培養に用いた。繁殖に用いた親マウスはプラスチックケージの中に収容し、室温 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $60\pm 2\%$ 、12 時間の明暗サイクル（AM7：00 点灯、AM7：00 消灯）の環境で飼育した。なお、餌（CE-2、日本クレア）および水は自由に摂取できるようにした。

実験動物の取り扱いには福岡大学動物実験委員会（Experimental animal care and use committee）による動物倫理規定に準じた。

1-2 実験方法

1-2-1 $A\beta_{1-40}$ 慢性暴露アストロサイト初代培養標本の作製手順

①ICR 系統マウスから生まれた仔マウス（生後 0～2 日）をアルコール消毒し、滅菌処理したハサミで断頭した。

②滅菌処理したピンセットを用いて頭皮および頭蓋骨を剥がし、露出した全脳をマイクロサテールですくうようにして取り出した。

③冷却した HBSS 溶液（Hank's Balanced Salt Solution, invitrogen）に脳を浸し、顕微鏡下でピンセットを用いて素早く大脳皮質を取り出し、表面の血管及び硬膜を除去した。

④取り出した大脳皮質を、Trypsin / EDTA 溶液が 1 mL 入った 1.5 mL チューブ（Eppendorf）に入れ、 37°C 、700 rpm で 20 分間攪拌した。

⑤攪拌後、チューブ中の Trypsin / EDTA 溶液を除去し、適量の 10% FBS 含有 D-MEM 溶液

(10% FBS 溶液) でリンスした。10% FBS 溶液の組成は以下の通りである。

10% FBS 含有 D-MEM 溶液の組成

50 mL	Heat-inactivated FBS (invitrogen)
1 mL	Penicillin-Streptomycin (invitrogen)
0.5 mL	MITO ストック* (BD Bioscience)
450 mL	D-MEM (GlutaMAX-I含有、invitrogen)

*MITO+Serum Extender (BD Bioscience) 1 ボトルに超純水を 5 mL 加えて溶解し、
1.5 mL チューブに 0.6 mL ずつ分注して冷凍保存した。

⑥リンス後に 10% FBS を除去し、新たに 10%FBS 溶液を 1 mL 加え、1000 μ L ピペットマンに装着したブルーチップで脳皮質を数回攪拌単離した。

⑦攪拌単離した液の上清 1 mL を、あらかじめ 10%FBS 溶液 10 mL を入れておいた 25 cm² の培養フラスコ (Falcon) に入れ、Incubator 内で 24 時間程度培養した。

⑧24 時間後、メディウム中の浮遊細胞を除去するため、メディウムをパスツールピペットで吸引除去し、新たに 10% FBS 溶液を 10 mL 入れインキュベーター内で 3 週間培養した。
(このとき、アストロサイトがフラスコ底面に付着している事を顕微鏡下で観察した。)

⑨アストロサイトがフラスコ底面に十分育っていることを確認し、フラスコを平らな場所で数回打ちつけてアストロサイト以外の混在するグリア細胞等を機械的に除去した。

⑩37℃に温めておいた Trypsin / EDTA 溶液 10 mL をフラスコに加えて 5 分間程度インキュベートし、フラスコ底面からアストロサイト層を剥離した。

⑪アストロサイト層が剥離され細胞が単離されていることを顕微鏡下で確認し、10% FBS 溶液 10 mL を加え、Trypsin / EDTA の酵素活性を止めた。

⑫アストロサイト混濁液を 50 mL チューブ (Falcon) に移し、さらに 10 mL 程度の 10% FBS 溶液をフラスコに加えて 1~2 回リンスした。

⑬細胞が入った 50 mL チューブを 37℃、1,000 rpm で 3 分間遠心し、細胞を沈殿させた。

⑭遠心後、上清を吸引除去し、新たに 10% FBS 溶液 1 mL を加えた。

⑮1000 μ L ピペットマンに装着したブルーチップで細胞塊を数回攪拌した。

⑯細胞白濁液を 10 μ L 採取し、細胞カウンター (BECTON DICKINSON) を用いてアストロサイトの数を数えた。

⑰カウント数をもとに 1 well 当たりの細胞数が 100,000 個となるよう、PDL/Collagen でコーティング*を施したカバーガラス (Matsunami 22mm 丸型 No.1) を置いた 6 well プレート (BECTON DICKINSON) に培養アストロサイトを播き、1 週間程度培養した。メディウム

はアストロサイト初代培養で用いた 10% FBS 溶液とし、各 well に 2 mL 入れた。

＊コーティングしたカバーガラスの作成

1：質量分率 65%の硝酸を用いてカバーガラスを数時間攪拌洗浄し、蒸留水で一晩攪拌洗浄することで脱脂処理を施した。

2：脱脂処理後のカバーガラスを 6 well プレートに一枚ずつ入れ、UV ランプを 40 分間照射し殺菌した。

3：0.5% Agarose (SIGMA) 溶液を作成し、綿棒を用いてカバーガラスに塗布後、UV ランプを 40 分間照射して殺菌し、室温で一晩乾燥させた。

4：約 4 mg/mL Collagen I, rat tail (BD Bioscience) 0.5 mL と 1mg/mL Poly-D-Lysine, hydrobromide (Sigma) 溶液 0.5 mL を混合し、コーティング液とした。

5：Agarose 処理したカバーガラスにコーティング液を塗布し、UV ランプを 40 分間照射殺菌後、室温で十分乾燥させた。

1-2-2 $A\beta_{1-40}$ 調整と培養アストロサイトへの投与手順

① $A\beta_{1-40}$ (Sigma) を 100% 1, 1, 1, 3, 3, 3-hexafluoro-2-propanol (HFIP, Sigma) に溶解し、4℃で 2 時間攪拌させ、使用時に 50 μ M の濃度となるように分注した後、真空デジケーターを用いて HFIP を揮発させ、-80℃フリーザーに保存した。

②1-2-1 の手順で準備したアストロサイトをさらに 2 週間培養し、①で保存した $A\beta_{1-40}$ を最終濃度が 0.5 μ M となるように投与した ($A\beta$ 群)。溶媒対照群には 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES、Sigma) buffer (Control 群) を用いた。

③ $A\beta_{1-40}$ 投与後 72 時間インキュベートしたものを標本として老化細胞測定に用いた。

1-2-3 β -galactosidase 染色法による老化細胞の定性

1. 試薬の準備

- ①キット同梱の X-gal solution を 37℃で 1 時間温めた。
- ②キット同梱の 10×Fixation Buffer を滅菌水で 10 倍に希釈し、1×Fixation Buffer を作製。希釈後は-20℃で保存した。
- ③10×PBS を滅菌水で 10 倍希釈し、1×PBS を作製した。希釈後は 2-8℃で保存した。
- ④Staining Mixture を作製した。組成は以下に示す。（全てキット同梱）

{	• 1 mL	10×Staining Solution
	• 125 μ L	Reagent B
	• 125 μ L	Reagent C
	• 0.25 mL	X-gal Solution
	• 8.50 mL	超純水

2. β -ガラクトシダーゼ染色および撮影手順

- ①培養標本のメディアウムをパスツールピペットで吸引除去した。
- ②1 mL / well の 1×PBS で 2 回洗浄する。細胞が剥がれないように 6 well プレート
の壁面を伝わせて洗浄した。
- ③1.5 mL の 1×Fixation Buffer を加え、室温で、6-7 分間静置し、固定を行った。
- ④②と同様の方法で、1 mL / well の 1×PBS で 3 回洗浄した。
- ⑤1 mL / well にて Staining Mixture を入れた。
- ⑥乾燥を防ぐためにパラフィルムで密閉し、37℃、CO₂ 無し的环境下で細胞が青く染色されるまで 4-6 時間インキュベートした。
- ⑦実体顕微鏡下で細胞を観察し、最適なインキュベート時間で Staining Mixture を PBS で 3 回洗浄して反応を止めた。
- ⑧ProLong® Gold antifade reagent with DAPI (life technologies) をスライドガラスに 150 μ L 置き、その上に細胞接着面が下になるようにガラスをゆっくり置いた。このとき、ガラスの背面の水分をしっかりと拭き取り、ガラスからはみ出した試薬はクレシアで軽く拭き取った。
- ⑨AZ100 (Nikon) を用いて観察を行った。 β -galactosidase 活性は可視下観察した。

1-2-4 Nuclear Factor- κ B (NF- κ B) 染色法の手順

実験には β -galactosidase 染色と同様に、5 週間培養アストロサイトを用いた。

・試薬の準備

○10×PBS 溶液 (100 mL) 室温保存

- | | | |
|-----------------------|------|--|
| • PBS 粉末 (組織洗浄用、Wako) | 1 袋 | } Tris-base で pH 7.4 に調節し、
超純水で全量 100 mL にした。 |
| • KCl | 0.2g | |
| • 超純水 | | |

○20% Triton X-100 in 1×PBS 溶液 (20 mL) 室温保存

- | | | |
|---|----------------|-------|
| } | • Triton X-100 | 4 mL |
| | • 1×PBS 溶液 | 16 mL |

○4% PFA in 1×PBS 溶液 (用時調整)

- | | | |
|-------------------------------|-------|---|
| • パラホルムアルデヒド (nakalai tesque) | 4 g | } 65°Cの超純水に PFA 4 g を入れ、
攪拌しながら NaOH を数滴ずつ溶
けるまで添加した。冷却後、
pH7.0-7.8 であることを確認し、
10×PBS 溶液、sucrose を加え
超純水で全量を 100 mL とした。 |
| • 10×PBS 溶液 | 10 mL | |
| • sucrose (invitrogen) | 2 g | |
| • 超純水 | 60 mL | |

○0.1% Triton X-100 in 1×PBS 溶液 (用時調整)

20% Triton X-100 in PBS を 1×PBS 溶液で 200 倍希釈した。

○NF- κ B p65 (E498) Antibody in antibody solution (一次抗体溶液)

- | | |
|---|---|
| } | • NF- κ B p65 (E498) Antibody (1:100, Cell Signaling Technology) |
| | • 2% Normal goat serum (NGS, Sigma) |
| | • 0.1% Triton X-100 溶液 |
| | • 0.1 M Tris + 0.15 M NaCl |

○anti-rabbit Alexa Fluoro 488 Antibody in antibody solution (二次抗体溶液)

- | | |
|---|--|
| } | • anti-rabbit Alexa Fluoro 488 (1:400, Molecular Probes) |
| | • antibody solution |

・免疫染色の手順

実験には5週間培養アストロサイト（Control 群、A β 群）を用いた。

- ①培養標本の各 well を1×PBS 溶液で3回洗浄した。
- ②各 well に4% PFA 溶液 2mL を加え15 分間静置し、細胞を固定した。
- ③各 well を1×PBS 溶液で3回洗浄した。
- ④パラフィルム上に一次抗体溶液を150 μ L 置き、各 well からピンセットでガラスを取り出し、細胞接着面が接するように溶液状に置いた（upside-down）。ガラスが溶液に沈んでいないこと、空気の混入がないことを確認した。一次抗体反応は4℃で一晩静置した。
- ⑤1×PBS 溶液で3回洗浄した。
- ⑥④と同様の方法で、二次抗体と反応させた。二次抗体反応は室温で1 時間遮光静置した。
- ⑦1×PBS で3回洗浄した。
- ⑧ProLong® Gold antifade reagent with DAPI（life technologies）をスライドガラスに150 μ L 置き、その上に細胞接着面が下になるようにガラスをゆっくり置いた。このとき、ガラスの背面の水分をしっかりと拭き取り、ガラスからはみ出した試薬はクレシアで軽く拭き取った。
- ⑨共焦点顕微鏡 LSM710 ZEM（Carl Zeiss）を用いて蛍光観察を行った。495 nm の励起光をレーザー照射し、519 nm の蛍光波長を観察した。

1-2-5 統計処理

2 群間の統計処理には、Student's t-test を使用した。

2 実験結果

2-1 $A\beta_{1-40}$ を慢性暴露したアストロサイトの β -galactosidase 活性の定量

培養アストロサイトに $0.5 \mu\text{M}$ $A\beta_{1-40}$ を 72 時間慢性暴露させ、老化細胞の指標として用いられる β -galactosidase 活性を測定した。図 1A は β -galactosidase 染色による染色像の典型的な写真を示している。解析は適当な 5 箇所を無作為に撮影し、全範囲に占める、青く染まった β -galactosidase 活性の高い細胞の面積を比率として定量した。この比率が高いほど、アストロサイトの老化が促進したことを示している。結果は、 $A\beta$ 群では有意にその比率が高く (Control: $N=4$, 2.11 ± 0.38 , $A\beta$: $N=4$, 6.38 ± 1.19 ; ***, $p < 0.001$, 図 1B)、 $0.5 \mu\text{M}$ $A\beta_{1-40}$ を 72 時間暴露することで、アストロサイトの細胞老化が促進することが明らかとなった。

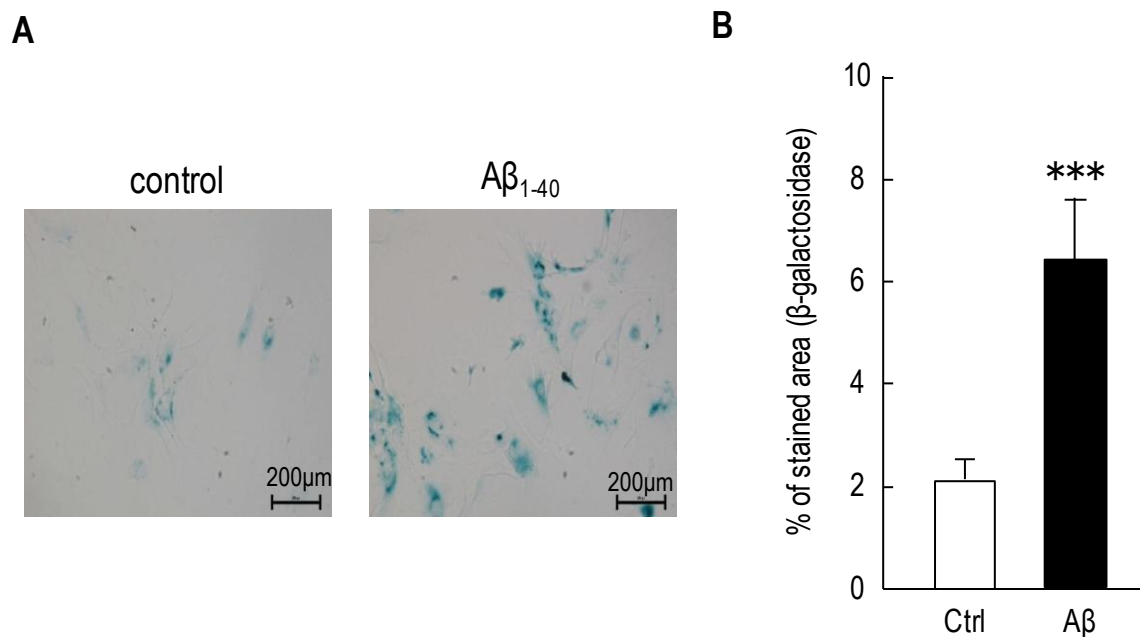


図 1 $A\beta_{1-40}$ 慢性暴露により培養アストロサイトの老化は促進する

2-2 $A\beta_{1-40}$ の慢性暴露による炎症反応の誘導に関する検討

一般的に *in vitro* 研究において、細胞は酸化ストレスやラジカル反応、またそれに伴う炎症反応により、老化が促進することが知られている^{76, 77, 78, 79, 80}。アルツハイマー病に関する研究においても、高濃度の $A\beta_{1-42}$ は炎症反応を誘導し、細胞老化を促進することが報告されている⁷⁵。本節では NF- κ B 染色法を用いて炎症反応の有無を確認した。NF- κ B は無刺激状態では抑制分子 I κ B との複合体として細胞質中に存在しているが、炎症性サイトカインなどの刺激を受けると、I κ B キナーゼによって I κ B がリン酸化され、さらに分解される結果、NF- κ B が遊離され、核内へと移行する。図 2A には、NF- κ B (green) と DAPI (blue) を二重染色した時の典型的な写真を示しており、図中のコバルトグリーンで示される細胞は、炎症反応により NF- κ B が核内に移行している細胞である。図 2B は DAPI 染色、NF- κ B 染色ともに陽性である細胞の比率をグラフ化したものである。結果は、2 群間で有意な差はなく (Control: N=4, 7.49 ± 2.97 , $A\beta$: N=4, 5.95 ± 2.08 , 図 2B)、本研究に用いた条件において、 $A\beta_{1-40}$ は炎症反応を誘導しないことが示唆された。

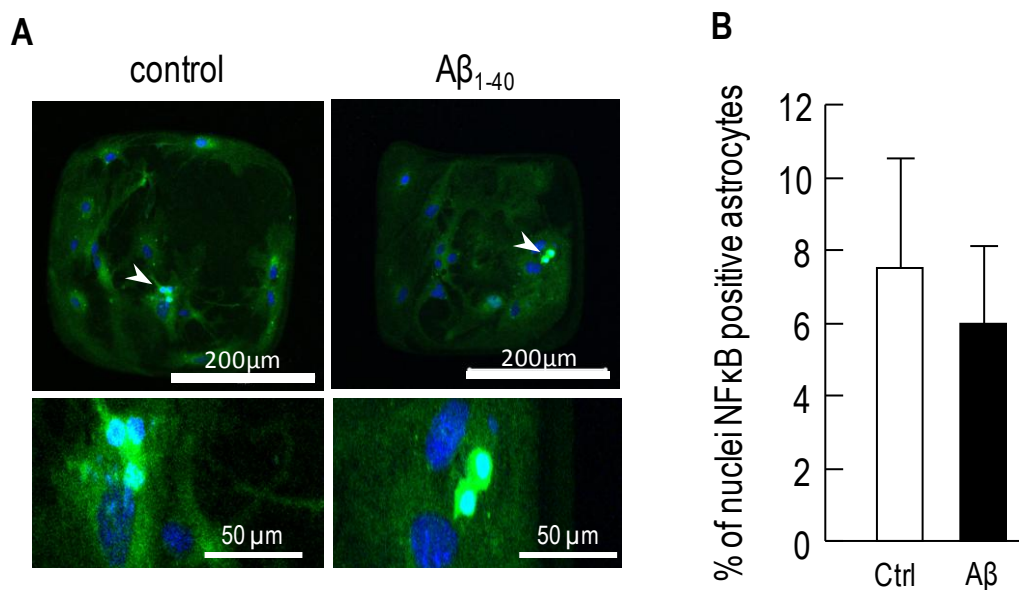


図 2 $A\beta_{1-40}$ による老化は炎症反応を誘導を伴わない

3 考察

老化には時系列に従った自然老化と、病態などの何らかの過剰な細胞ストレスにより生じる異常老化が存在すると考えられている。自然老化、異常老化を問わず、老化により脳組織には多くの変化が見られ、脳萎縮やニューロンの樹状突起の後退、スパインの減少などによる、記憶・学習機能に関わる脳部位の後退や^{81, 82, 83, 84)}、炎症性サイトカイン、インターフェロン発現の増加などといった免疫反応の亢進による神経障害作用が顕著になる^{85, 86, 87)}。アルツハイマー病の原因物質の1つであるA β による老化促進作用に関しては、濃度依存的な老化促進作用の亢進、IL-6発現の増加などが明らかとなっているか詳細な機序は不明である⁷⁵⁾。高濃度のA β は神経細胞死や炎症反応を誘導することが知られているが、本研究で用いた0.5 μ M A β ₁₋₄₀はDAPI染色の結果から、アストロサイトの細胞死誘導は認められず、また、NF- κ B染色の結果から、炎症反応も認められなかった。

本研究に用いた老化細胞測定は、 β -galactosidaseが、5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -galactosidase (X-gal)の加水分解を促進する触媒であり、老化細胞ではpH6付近で β -galの活性が高いことを利用している。この試薬の性質は、老化細胞が優先して反応するが、老化細胞を特異的に検出するものではないため、実際にはどの程度の割合の細胞が老化しているのかを定量することができない。今回の解析法は、37℃で6時間反応させて β -gal陽性細胞の占める比率を定量したが、Control群で2%、A β 群でも6%程度であった。DAPI染色も同時に行っているので、より正確な割合を求めるために、アストロサイトの細胞数全体に占める老化細胞数の割合の解析も試みたが、 β -gal染色では細胞核のみならず、細胞体も一部染色されてしまうので、 β -gal陽性細胞数がアストロサイト数とは相関をもたないという問題がある。今回の結果から、アストロサイトはA β に対する感受性が異なる可能性も考えられたが、A β 群では β -gal陽性細胞の割合が有意に増加していたことから、共培養したニューロンに対する老化細胞の寄与度が高くなると考えられた。よって、老化型アストロサイトのシナプス機能修飾作用を解析することが可能となった。A β の老化促進作用は濃度依存的に、また、反応時間依存的に増加することが報告されており⁷⁵⁾、老化細胞の占める割合の変化によるシナプス機能修飾作用の差異の解析を行うことも今後の課題である。

第2章 長期培養による自然老化型アストロサイトを用いた、ニューロンの興奮性シナプス伝達の低下作用

第1章の結果から、アルツハイマー病の原因物質の1つと考えられている $A\beta$ は、アストロサイトの異常老化を誘導することが明らかとなった。アストロサイトの長期培養による自然老化では、培養9週間以上では老化細胞の指標となる β -galactosidase活性の増加は認められなかったが(5w: $N=3$, $11.5 \pm 2.8\%$, 9w: $N=3$, $26.1 \pm 2.1\%$, 16w: $N=3$, $24.0 \pm 2.3\%$; **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$, vs 5w, 図3B)、 $A\beta$ 暴露により自然老化アストロサイトの老化がさらに促進することが確認された(5w: $N=4$, $3.07 \pm 0.47\%$, 9w+ $A\beta_{1-40}$: $N=4$, $4.67 \pm 0.59\%$, *, $p < 0.05$, 図4B)。このことから、自然老化と異常老化は異なる分子メカニズムで老化が促進することが示唆され、この老化促進メカニズムの差異がアルツハイマー病特有のシナプス病態や認知機能障害などの症状を引き起こす原因となっている可能性がある。そのため、本章では、まず、アストロサイトの自然老化がシナプス伝達に及ぼす影響を解析した。

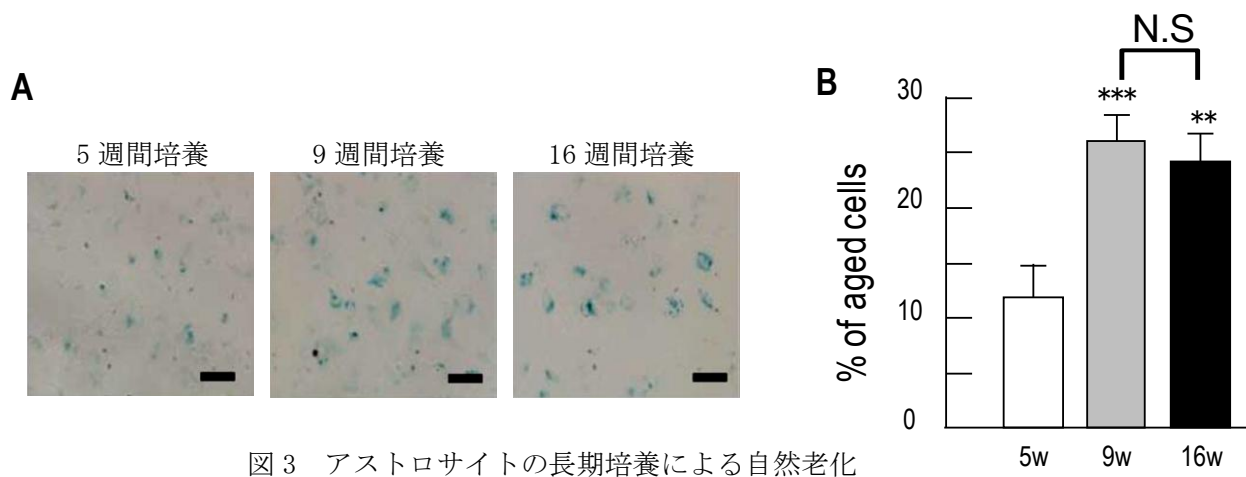


図3 アストロサイトの長期培養による自然老化

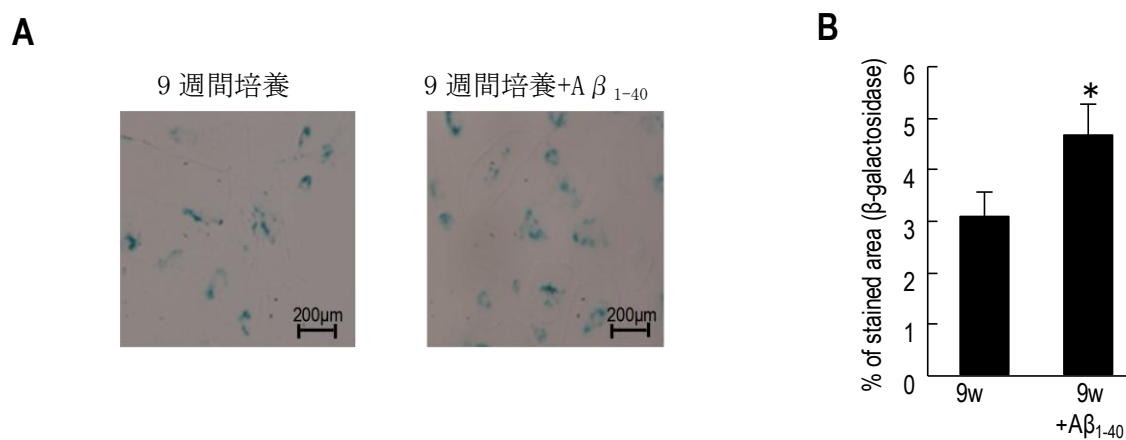


図4 自然老化型アストロサイトの $A\beta_{1-40}$ による異常老化促進

第1節 アストロサイトの自然老化に基づくシナプス修飾作用の解析

1 実験材料ならびに実験方法

1-1 実験動物

本項に用いた実験動物は第1章 1-1 と同様の ICR 系統マウスである。

1-2 実験方法

1-2-1 オータプス培養標本の作製手順

①第1章 1-2-1 の①～⑯と同様の手順で培養アストロサイトを処理し、1well 当たりの細胞数が 25,000 個となるように、PDL / Collagen でパターンコーティング*したガラスを置いた 6well プレートにアストロサイトを播き、1週間程度培養した。なお、老化型アストロサイト標本作製のため、a) 2週間培養アストロサイトに加えて、b) 6週間、c) 13週間の3種類の培養アストロサイトを各 well に培養した。（シナプス解析を行うときの最終的な培養期間（+3週間）を考えて、a) 5w 群、b) 9w 群、c) 16w 群とした）

*パターンコーティングしたカバーガラスの作成

1：第1章 1-2-1 のコーティング手順 1-4 と同様の処理を行った。

2：スタンプには、ドットサイズ 300×300 μm 、ドット間隔 300 μm のものを用いた。

3：35 mm Culture dish (BECTON DICKINSON) にキムワイプを丸く切ったものを 3 枚程敷き、スタンプ液を 100-200 μL 入れ、これをスタンプ台とした。

4：Agarose 処理したカバーガラスにスタンプ後、UV ランプを 40 分間照射し殺菌し、その後室温で十分乾燥させた。

②プレート内でアストロサイトがドット状に育ったことを確認した。

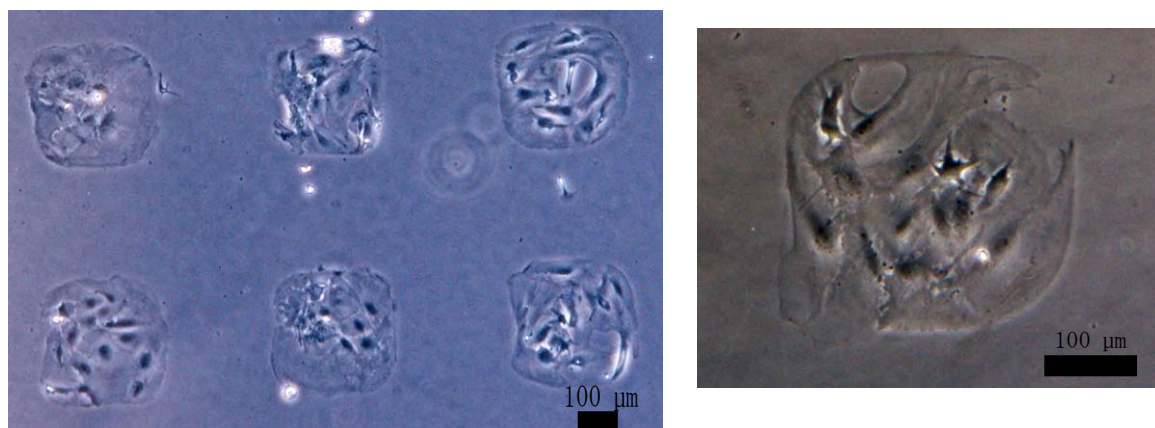


図5 ドット状にパターン培養したアストロサイト

③図 5 に示すように②のドット状アストロサイト培養標本に低密度の海馬ニューロンを蒔く直前に well 内のメディウムを吸引除去し、下記に示す NBA 溶液 2 mL に置換した。

NBA 溶液の組成

5 mL	B27-Supplement (invitrogen)
2.5 mL	Glutamax-I (invitrogen)
0.5 mL	Penicillin-Streptomycin (invitrogen)
242 mL	Neurobasal A-Medium (invitrogen)

④第一章 1-2-1①-③と同様の操作で ICR マウスの全脳を摘出し、海馬を取り出した。Enzyme 溶液が 800 μ L 入った 1.5 mL チューブ に取り出した海馬を入れ、37°C、750 rpm で 50 分間酵素処理した。

Enzyme 溶液の組成

10 mg	L-Cystein hydrochloride monohydrate (Sigma)
0.5 mL	100mM CaCl_2 溶液 (Sigma)
0.5 mL	50mM EDTA 溶液 (Sigma)
50 mL	D-MEM

上記 2.5 mL に対して papain (Worthington) 50 μ L を添加して用事調整し、95% O_2 , 5% CO_2 混合ガスで 20 分間程度バブリングした。

⑤Enzyme 溶液を除去し、Inactivation 溶液 500 μ L に置換し、37°C、700 rpm で 12 分間攪拌した。

Inactivation 溶液の組成

125 mg	Trypsin inhibitor from chicken egg white (Sigma)
125 mg	Albmin bovine serum initial fractionation by heat shock (Sigma)
50 mL	10% FBS 溶液

⑥Inactivation 溶液を除去し、NBA 溶液でリンス後、新たに 100 μ L 添加した。

⑦NBA 溶液中でピペットマンを用いて海馬をゆっくり攪拌単離した。

⑧1 分程度静置して、上清 100 μ L を NBA 溶液が 800 μ L 入った 1.5 mL チューブに移した。

⑨組織片が残っている⑥のチューブに新たに NBA 溶液を 100 μ L 入れ、⑧と同様に操作した。

⑩細胞カウンターでニューロン数を数え、③までの操作を行ったプレートに 1 well 当たり 6,000 個になるようにニューロンを播き培養を開始した。

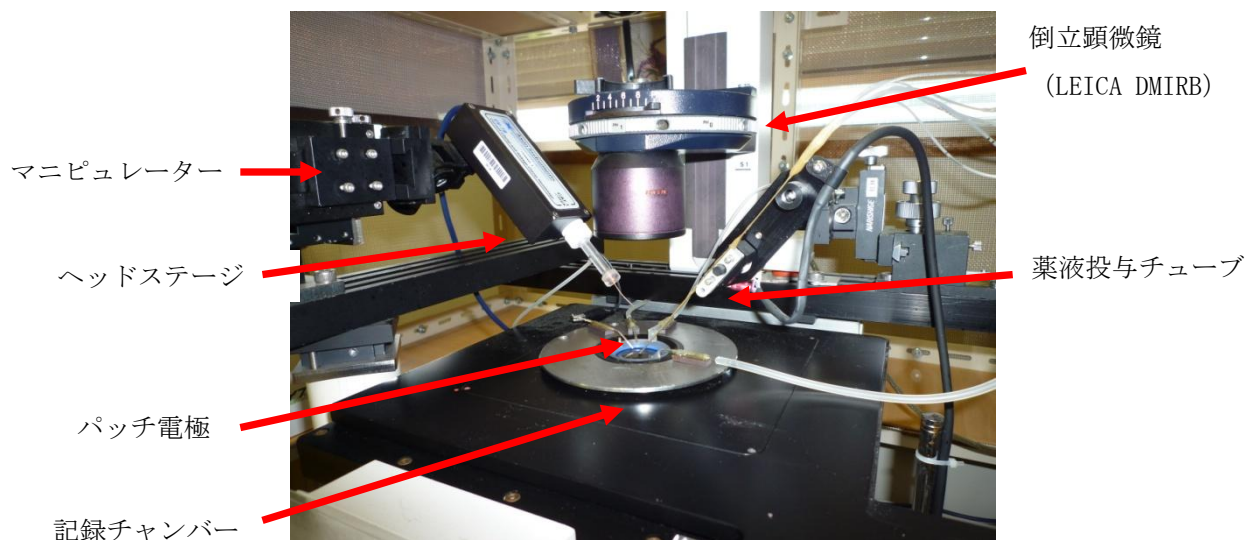
⑪シナプス解析はニューロン培養後 13-15 日で行った。尚、アストロサイトからの液性因子を保持するために、ニューロン培養期間中はメディウム交換を行わなかった。

1-2-2 ホールセルパッチクランプ法を用いたシナプス解析

パッチクランプ法は細胞膜において単一または複数のイオンチャネル分子の活動を、それを通るイオン電流として記録する方法で、1976 年に Neher と Sakmann によって開発された（岡田泰伸：新パッチクランプ実験技術法）。

本法は、細胞膜にガラス管微小ピペット（パッチ電極）をギガ・オーム ($G\Omega$) 以上の高抵抗で密着（ギガ・シール）させ、その先端開口部の微小膜領域を電氣的に他の領域と隔絶した状態で電位固定し、そこに含まれるイオンチャネルを通るイオン電流を計測する方法である。

・パッチクランプ装置の概略



電流はパッチクランプアンプ (Multi Clamp700B, Molecular Device) を用いて測定し、DIGIDATA 1320A (Axon Instruments) を介して、pClamp 10 (Molecular Device) を用いて記録した。記録は 20 kHz でサンプリングし、10 kHz のフィルターを介してコンピューターに取り込んだ。パッチ電極は BORO SILICA GLASS (SUTTER INSTRUMENT CO.) を用いて FLAMING/BROWN MICROPIPETTE PULLER (SUTTER INSTRUMENT CO.) で作製した。

チャンバー内を還流する細胞外液の組成

1400 mM	NaCl (和光純薬工業)
24 mM	KCl (林純薬工業)
100 mM	HEPES (Promega)
100 mM	Glucose (和光純薬工業)
20 mM	CaCl ₂ ×2H ₂ O (和光純薬工業)
10 mM	MgCl ₂ ×6H ₂ O (和光純薬工業)

超純水で 1L にメスアップし、
これを 10×ストックとして用
事希釈して用いた。pH は
Tris-base を用いて 7.4 に調節
した。

細胞内を還流するパッチ内液の組成

1.0 mL の ATP-GTP stock 溶液 (10×) と 0.1 mL の 100 mM K-EGTA 溶液と
8.9 mL の K-Gluconate-HEPES 溶液を混合した。溶媒は超純水を用いた。

*ATP-GTP stock 溶液 (10×) の組成

120 mM	Phosphocreatin (Sigma)
3 mM	GTP-Na (Sigma)
40 mM	ATP-Mg (Sigma)
500 units	Creatine-phosphokinase (Sigma)
6 mM	MgCl ₂

超純水で 10 mL にメスアップし、
1.2 mL ずつ分注し冷凍保存
した。pH は 7.48 に調節した。

*100mM K-EGTA-stock 溶液の組成

0.1M EGTA 液 (Sigma) を 500 μ L ずつ分注し冷凍保存した。pH は KOH を用いて 7.4 に調
節した。

*K-Gluconate-HEPES 溶液の組成

164.4 mM	K-Gluconate (Sigma)
20 mM	HEPES

超純水で 100 mL にメスアップし、
9 mL ずつ分注し冷凍保存した。pH
は 7.4 に調節した。

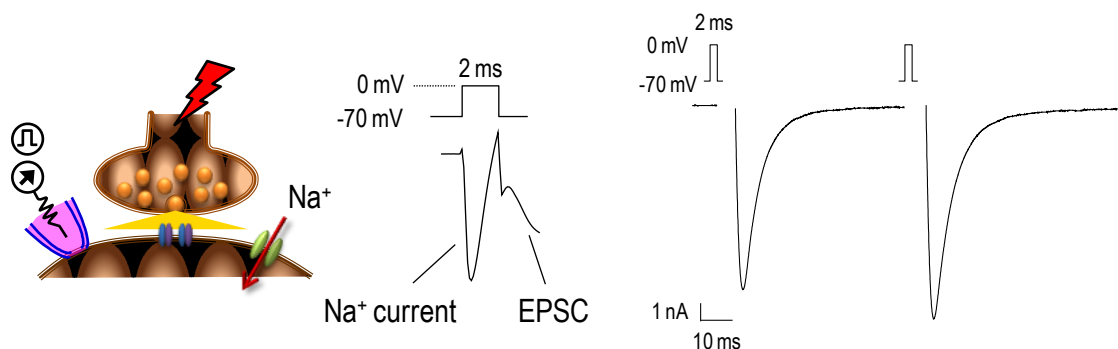
・シナプス電流計測の操作手順

- ①作成したオータプス培養標本のプレート中のカバーガラスをダイヤモンドペンで分割し、倒立顕微鏡の記録チャンバーに設置した。
- ②内液を充填したパッチ電極をヘッドステージに設置し、マニピュレーターを用いて顕微鏡下でガラス電極を操作し、陽圧下でニューロンの細胞体表面に電極の先端を近づけた。
- ③5 mV、10 ms の矩形波を連続的に加え、矩形波の振幅が減少する（抵抗値が上がる）ことを確認後に陽圧を解除し、三方活栓につないだシリンジを吸引してパッチ電極内圧を陰圧にしながらかパッチ電極と細胞表面にギガオームシールを形成した。
- ④膜電位を-70 mV に固定し、ギガ・シールになったことを確認後、シリンジを吸引して高陰圧を与え、パッチ電極下の細胞膜を破った。
- ⑤十分に細胞膜が破られたことを確認後、膜容量 (pF)、直列全抵抗値 (R_s) を補正した。
- ⑥パッチ電極から次に示す条件刺激を与え、下記に列挙するシナプス応答 (A~D) を基礎検討項目として計測した。

A : 興奮性シナプス後電流 (Excitatory Postsynaptic current, EPSC)

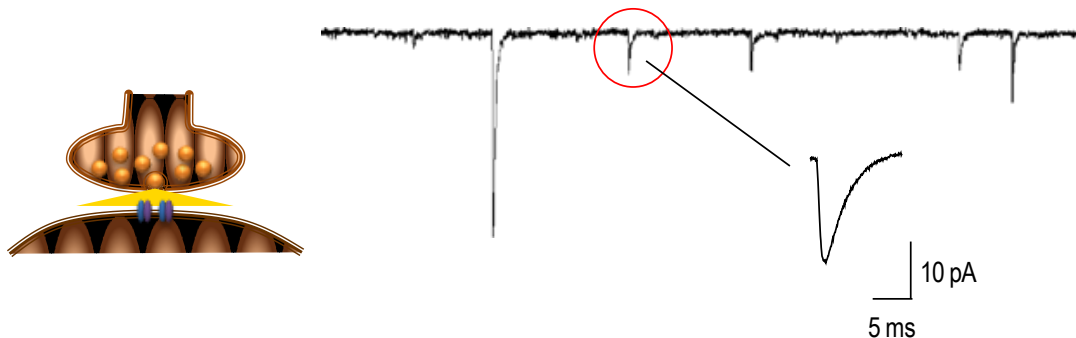
オータプスニューロンは自己にシナプスを形成しているため、保持電位 -70 mV から 0 mV への脱分極パルスを 2 ms 与えると、発生した活動電位が軸索を伝導し、シナプス前末端部に達するとシナプス小胞からグルタミン酸が放出される。グルタミン酸がシナプス間隙に放出され、シナプス後膜上の AMPA 受容体に結合し活性化されると Na^+ イオン透過性が増加する。観察される内向きの応答が EPSC と呼ばれるものである。EPSC の振幅 (EPSC amplitude, A) の値をシナプス伝達強度の指標とした。

また、50 ms の間隔で 2 回連続した時に観察される (2 発目の EPSC amplitude) / (1 発目の EPSC amplitude) の値を Paired-pulse ratio (PPR) として算出し、シナプス伝達効率の指標とした。



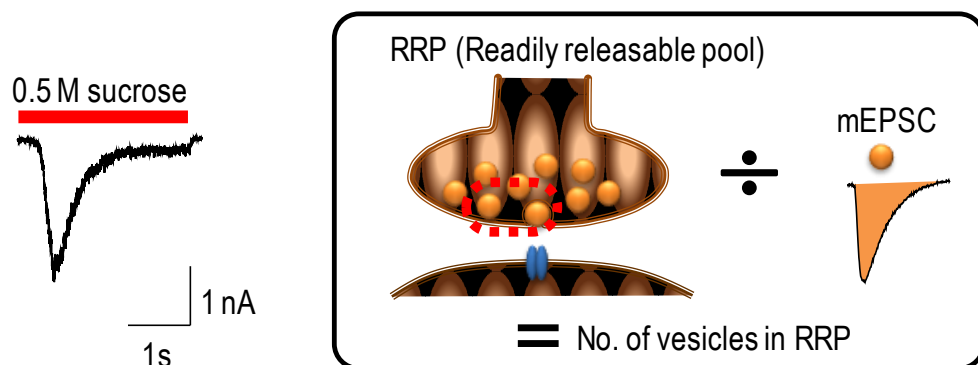
B : 自発性興奮性シナプス後電流 (miniature EPSC, mEPSC)

薬液投与チューブを用いて、オータプス標本に $0.5 \mu\text{M}$ のテトロドトキシン (TTX、フナコシ) を 60 秒間投与し、活動電位を抑制すると、自発性微小電流 (mEPSC) が観察される。内向きに観察される mEPSC の発生頻度 (Hz)、振幅 (A)、面積 (C) をそれぞれ測定した。なお、得られた値の平均値は、1 つのシナプス小胞が開口放出したものと近似できる。



C : Readily Releasable Pool (RRP) size

RRP とは、シナプス小胞が膜融合を受けて、いつでも開口放出ができる状態になったシナプス小胞群を意味する。薬液投与チューブを用いてオータプス標本に 0.5 M の高浸透圧 sucrose 溶液を 5 秒間投与し、内向きに観察される一過性の応答の面積 (C) を RRP サイズとした。更に RRP の面積を mEPSC (C) の平均面積で除し、RRP に含まれるシナプス小胞数の理論値を計算した。



D : シナプス小胞放出確率 (Vesicular release probability (Pvr) , %)

EPSC の面積 (C) を RRP の面積 (C) で除し、シナプス小胞の開口放出確率の指標とした。つまり、Pvr は 1 回の刺激 (活動電位) によって開口放出されるシナプス小胞の比率を意味する。

1-2-3 vGlut1, MAP2 染色によるニューロン形態およびシナプス形成の解析

・試薬の準備

○10×PBS 溶液 (第1章 1-2-4 の免疫染色の手順)

○20% Triton X-100 in 1×PBS 溶液 (第1章 1-2-4 の免疫染色の手順)

○4% PFA in 1×PBS 溶液 (第1章 1-2-4 の免疫染色の手順)

○0.1% Triton X-100 in 1×PBS 溶液 (第1章 1-2-4 の免疫染色の手順)

○Anti-vGlut1 + Anti-MAP2 in antibody solution (一次抗体溶液)

- Anti-vGlut1 (BNPI, 1:1000, Synaptic Systems)
- Anti-MAP2 (1:1000, Synaptic Systems)
- antibody solution

○Alexa 488 + Alexa 594 in antibody solution (二次抗体溶液)

- Alexa 488 (1:400, Molecular Probes)
- Alexa 594 (1:400, Molecular Probes)
- antibody solution

・免疫染色の手順

実験には 5w 群、9w 群、16w 群のオータプス培養標本を用いた。

①第1章 1-2-4 の免疫染色の手順①～⑧と同様の手順を行った。

②共焦点顕微鏡 LSM 710 ZEN (Carl Zeiss) を用いて蛍光観察を行った。Alex 594 は 594nm (HeNe)、Alexa 488 は 488 nm (Argon) の励起波長をレーザー照射し、それぞれの蛍光波長 (622 nm, 520 nm) を観察した。

1-2-4 FM1-43 蛍光染色によるアクティブシナプスおよびサイレントシナプスの解析

FM1-43 はエンドサイトーシスの過程においてシナプス小胞に取り込まれることで蛍光を発する。本検討ではオートプス標本をホルマリン固定後に蛍光観察を行ったため、FM1-43FX (Invitrogen) を用いた。

①5w, 9w, 16w の標本を作成し、ニューロン培養 15 日後に実験に用いた。

②6 well プレートの各 well を 1×BASE+溶液で洗浄した。

③ガラスをプレートからピンセットで取り出し、培養接着面ではない面についている液体を水にぬらしたクレシアで軽くぬぐい、乾いたクレシアで拭いた。

④パラフィルムの上に 15 μ M FM1-43FX、10 μ M CNQX、25 μ M APV (NMDA 受容体遮断薬、SIGMA) を添加した High K^+ BASE+溶液を 200 μ L 置き、培養接着面が接するようにピンセットでガラス標本を置いた (upside-down)。空気が混入していないことを確認して 2 分間静置した。なお、シナプス小胞のリサイクリングを強制的に活性化させるために、High K^+ BASE+溶液を用いた。10×high K^+ BASE+溶液の組成は以下の通りである。

○10×high K^+ BASE+溶液の組成

1190 mM	NaCl
450 mM	KCl
100 mM	HEPES
100 mM	Glucose
20 mM	CaCl ₂ ×2H ₂ O
10 mM	MgCl ₂ ×6H ₂ O

超純水で 500 mL にメスアップし、これを
10×ストックとして用事希釈して用いた。
pH は Tris-base を用いて 7.4 に調節した。

○FM1-43FX のストック調整

FM1-43FX は 5 mM ストックを作成して (1 vial (100 μ g) / 35.7 μ L D.W.)、3 μ L ずつ分注し、-80℃で保存。用事 15 μ M に調整した。

⑤非特異的な反応を防ぐために、ガラスを 500 μ M Advasep-7 (SIGMA) に約 5 秒間浸し、直ちに 1×BASE+で 5 分間洗浄した。洗浄は 2 回行った。

※ガラスを Advasep-7 に 10 秒以上浸すと、FM1-43FX が退色してしまうので、操作は素早く行った。

- ⑥各 well を 1×PBS で 3 回洗浄した。
- ⑦各 well に 4%PFA 溶液を入れて 10 分間静置し固定した。
- ⑧各 well を 1×PBS 溶液で 3 回洗浄した。
- ⑨③と同様の操作を行った。
- ⑩VECTASHIELD Hard Set (VECTOR) をスライドガラスに一滴置き、その上に染色面が下になるようにガラスをゆっくり置いた。ガラスからはみ出した試薬はクレシアで軽く拭きとった。
- ⑪共焦点顕微鏡 LSM 710 ZEN (Carl Zeiss) を用いて蛍光観察を行った。488 nm (Argon) のレーザー励起光を照射し、565 nm の蛍光波長を観察した。

1-2-5 統計処理

3 群間の統計処理には、Tukey 's test を使用した。

2 実験結果

2-1 老化型アストロサイトによるシナプス機能修飾作用に関する電気生理学的解析

最終培養期間がそれぞれ、5w, 9w, 16w のアストロサイトと、DIV. 13-15 のニューロンを共培養したオータプス培養標本を用いてシナプス解析を行った。図 6A には各群の典型的な EPSC の波形を示している。5w と 9w, 16w の EPSC amplitude を比較すると、9w, 16w では有意に低値を示し (5w: $n=80$, 8.52 ± 0.49 nA, 9w: $n=82$, 5.65 ± 0.34 nA, 16w: $n=86$, 4.95 ± 0.28 nA, ***, $p < 0.001$, 図 6B)、老化型アストロサイトがシナプス伝達を低下させた。また、 β -galactosidase 染色の結果と同様に、9 週間以上培養したアストロサイトでは有意な差が認められなかった (*Student's t-test*, 9w vs 16w)。

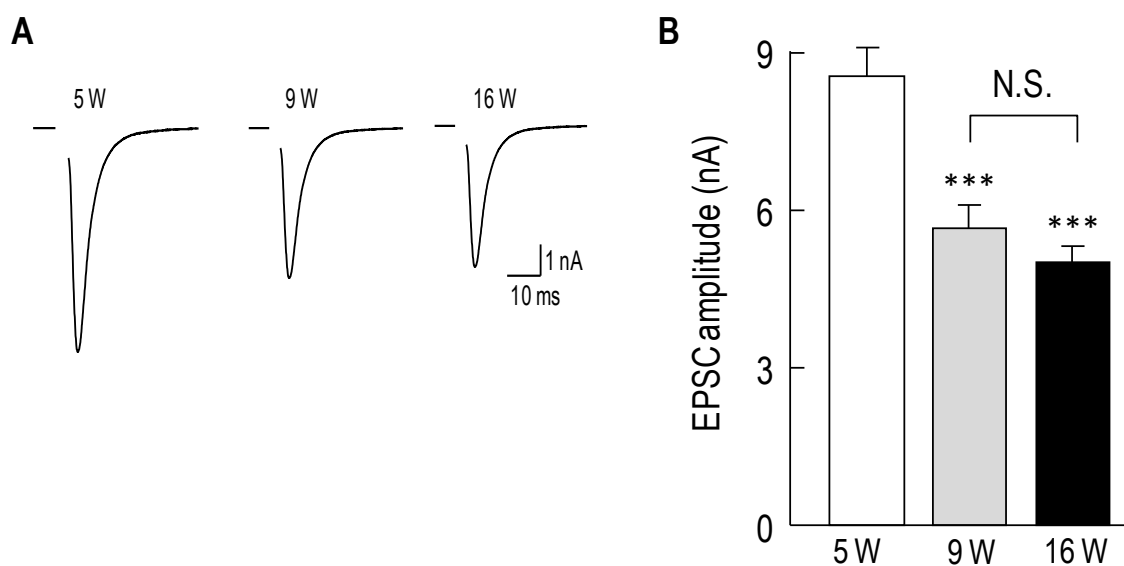


図 6 老化型アストロサイトは興奮性シナプス伝達を低下した

次に、テトロドトキシン (TTX, $0.5 \mu\text{M}$) 存在下で、mEPSC を記録した (実験方法参照)。図 7A は各群の典型的な波形を示しており、内向きに観察される微小な応答が mEPSC と呼ばれるものである。図 7B はその発生頻度 (frequency) の平均値を示し、図 7C は振幅 (amplitude) の平均値を示している。一般的に、mEPSC の解析では frequency がシナプス前終末の伝達物質放出の多寡の指標として、一方、amplitude はシナプス後膜の受容体の密度や感受性の指標として用いられる。結果は、3 群間で amplitude には差がなかったが (5w: $n=64$, 27.9

± 1.01 pA, 9w: $n=58$, 26.4 ± 0.83 pA, 16w: $n=58$, 26.7 ± 1.04 pA, 図 7C) 、frequency は 9w、16w で有意に低値を示した (5w: $n=64$, 5.03 ± 0.29 Hz, 9w: $n=58$, 3.92 ± 0.28 Hz, 16w: $n=58$, 3.42 ± 0.25 Hz, **, $p < 0.01$, 図 7B) 。以上の結果から、アストロサイトの老化によるシナプス修飾作用はシナプス前終末における開口放出の低下であることが示唆された。

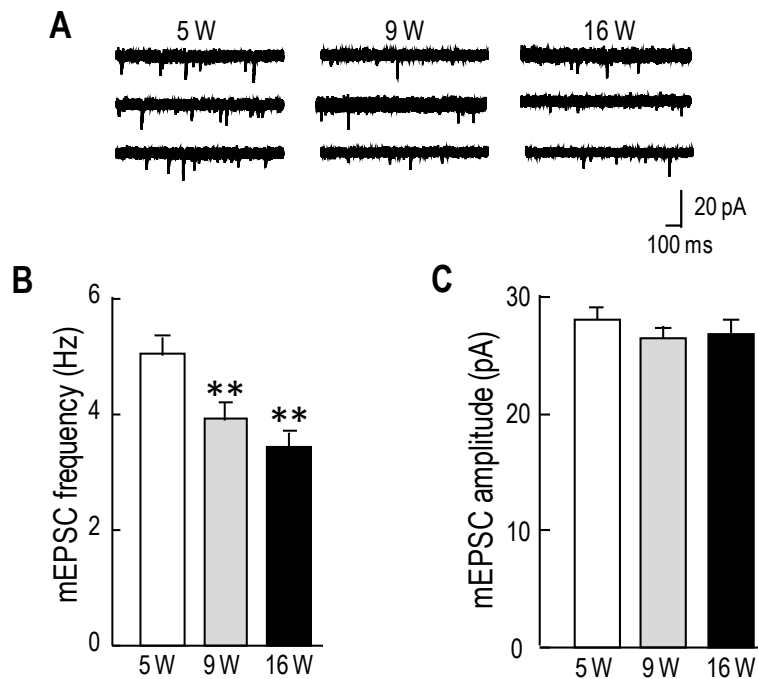


図 7 老化型アストロサイトによりシナプス前終末における開口放出が低下した

さらに、より詳細な解析を行うために、薬液投与チューブから 0.5 M sucrose を 10 秒間投与し、高浸透圧刺激による一過性の伝達物質放出量を測定した (実験方法参照) 。図 8A には各群の典型的な波形を示しており、sucrose 応答の面積を mEPSC の面積で除した値が RRP のシナプス小胞数の理論値を示す。結果は、EPSC amplitude と対応して、9w、16w では RRP におけるシナプス小胞数が有意に低値を示した (5w: $n=64$, 8646 ± 592 vesicles, 9w: $n=58$, 6369 ± 452 vesicles, 16w: $n=58$, 6133 ± 509 vesicles, **, $p < 0.01$, 図 7B) 。

以上の結果から、老化アストロサイトは 1) オータプスニューロンのシナプス形成を抑制するか、もしくは 2) シナプス伝達機能が低下することが示唆された。

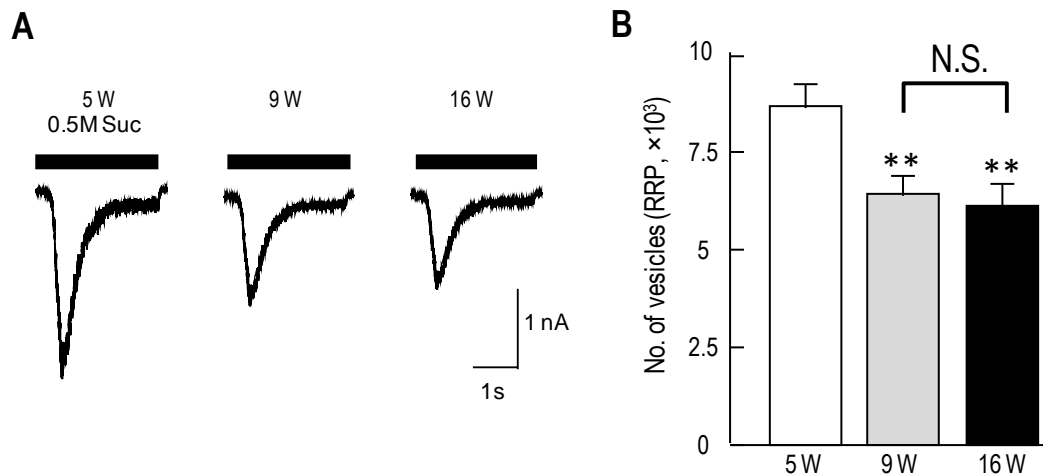


図8 アストロサイトの老化により RRP におけるシナプス小胞数が減少した

次に、シナプス開口放出機能について検討した。結果は、Pvr に差異は認められず (5w: $n=80$, $8.43 \pm 0.49\%$, 9w: $n=82$, $7.48 \pm 0.51\%$, 16w: $n=86$, $7.25 \pm 0.45\%$, 図 9A)、paired-pulse ratio (PPR) も 3 群間で有意な差は認められなかった (5w: $n=64$, 1.14 ± 0.032 , 9w: $n=58$, 1.09 ± 0.024 , 16w: $n=58$, 1.16 ± 0.029 , 図 9B)。以上より、シナプス伝達機能の低下の可能性は否定された。

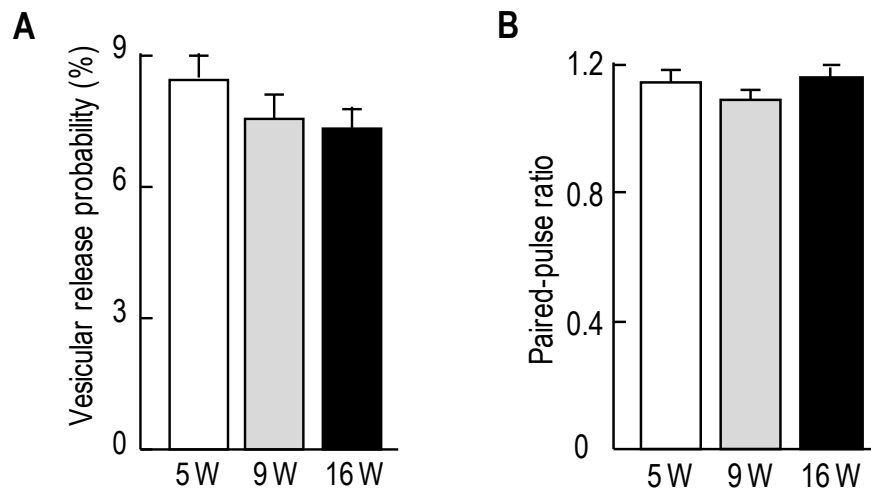


図9 老化型アストロサイトはシナプス伝達機能には影響を及ぼさない

2-2 老化型アストロサイトによるシナプス形成に関する組織免疫学的解析

前述した、老化型アストロサイトのシナプス機能修飾作用のメカニズムの可能性として、オータプスニューロンの形成に関する検討について組織免疫学的手法を用いて行った。実験は、vGlut1 と MAP2 染色を行った。シナプス小胞タンパクの一種である小胞型グルタミン酸輸送体 (vesicular glutamate transporter, vGlut) には主に、1-3 のサブタイプがあるが^{88, 89, 90)}、海馬ニューロンに局在する vGlut の多くは vGlut1 である^{91, 92)}。したがって、本節では vGlut1 抗体陽性シナプスを興奮性シナプスとし、またニューロンの形態を同時に観察するために、microtubule associated protein 2 (MAP2) 抗体で樹状突起を染色した (図 10)⁹³⁾。

図 10A の赤で染色された点が興奮性シナプス (グルタミン酸作動性シナプス) を示しており、緑で染色された樹状突起上にシナプスを形成していることが確認できた。解析は、vGlut1 陽性細胞数とそのサイズを指標として評価した。

結果、次頁に示すように、3 群間で vGlut1 抗体陽性シナプス数には有意な差が認められなかったことから (5w: N=33, 326.0 ± 33.3 , 9w: N=36, 322.0 ± 37.2 , 16w: N=41, 264.2 ± 26.7 , 図 10B)、老化アストロサイトによる、シナプス伝達低下の原因が興奮性シナプス形成の減少によるものではないことが示唆される結果となったが、一方、各群におけるニューロンの形態に著明な差異が観察された。

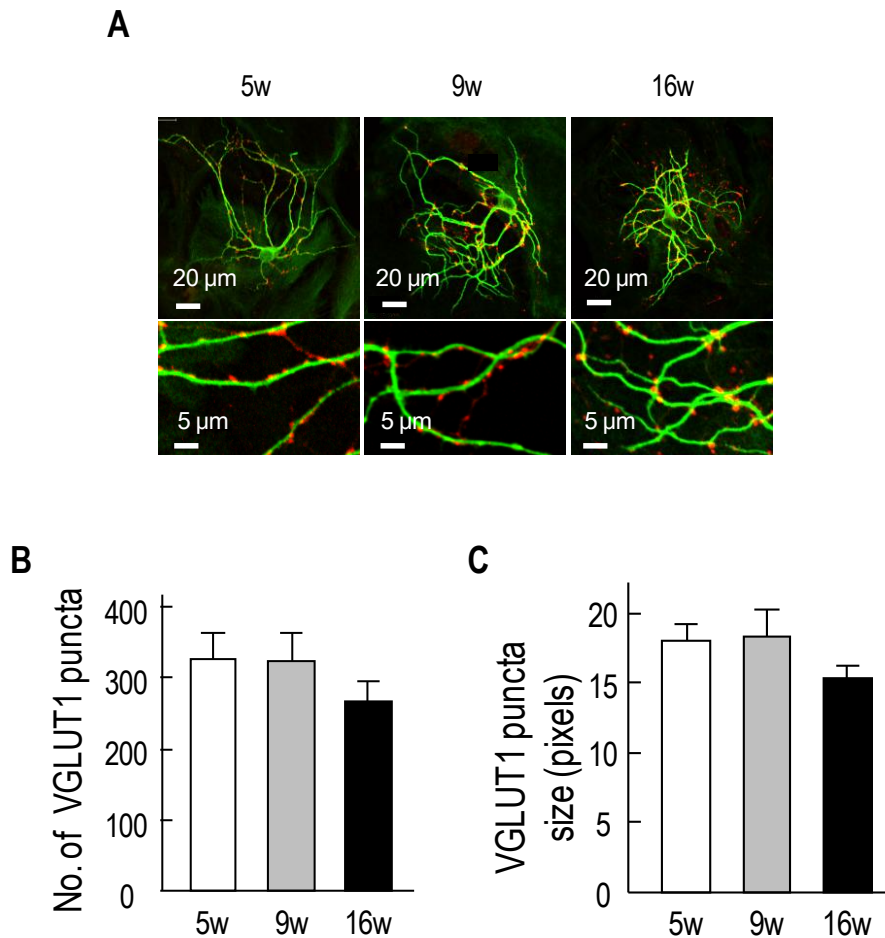


図 10 老化型アストロサイトは興奮性シナプス形成には関与しない

樹状突起の分岐点数と位置を形態変化の指標として解析を行うと、分岐点の数自体には有意な差が認められなかったが (5w: $N=33$, 114.55 ± 6.73 , 9w: $N=36$, 122.57 ± 8.82 , 16w: $N=41$, 101.41 ± 7.06 , 図 11A, B)、分岐点の位置が細胞体寄りに形成されていることが明らかとなった (5w: $N=33$, 114.55 ± 6.73 , 9w: $N=36$, 122.57 ± 8.82 , 16w: $N=41$, 101.41 ± 7.06 , 図 11A, C, *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$)。ニューロンの発達過程において、初期では樹状突起の分岐点が細胞体寄りに多く形成され、成熟に伴い空間的な広がりを持つことが知られており^{94,95,96)}、老化型アストロサイトは、成熟に関わる何らかの液性因子、もしくは何らかの内在性物質に影響を及ぼす可能性が示唆された^{97,98,99,100)}。

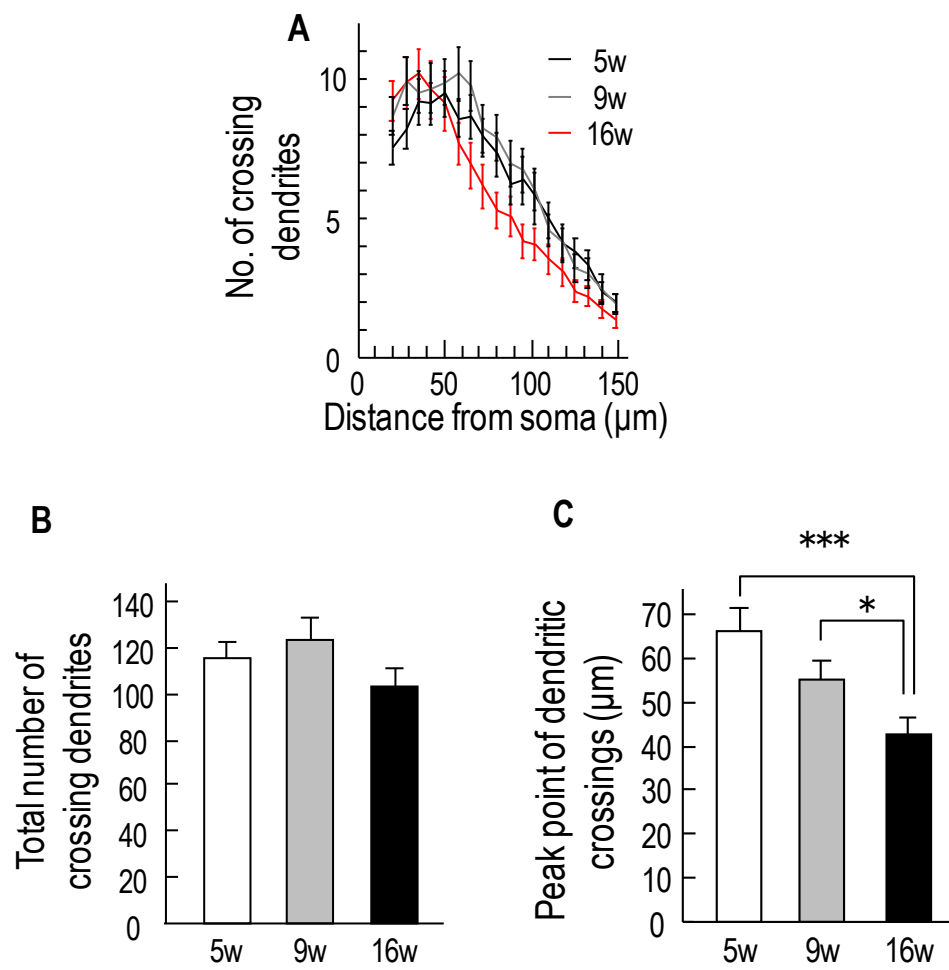


図 11 老化型アストロサイトによるニューロンの形態変化

2-3 老化型アストロサイトによる興奮性シナプス伝達低下のメカニズムに関する検討

2-3-1 サイレントシナプスの発現率に関する検討

第2章 2-2 までの検討で、老化型アストロサイトが興奮性シナプス伝達を低下する機序として、①シナプス伝達機能の低下、②シナプス形成能の低下の可能性が否定された。ここまでの結果を整理すると、老化アストロサイトと共培養したニューロンのシナプス伝達の低下はシナプス前終末における可塑的变化が原因であることが示唆された（表1）。

	9w, 16w (vs. 5w)
EPSC amplitude	低下
mEPSC frequency	低下
mEPSC amplitude	不変
RRPにおけるシナプス小胞数	低下
伝達物質開口確率	不変
興奮性シナプス数	不変(vGlut1)
興奮性ニューロンの形態	樹状突起の分岐点が細胞体寄り

シナプス前終末における開口放出量が低下しており、そのメカニズムは RRP におけるシナプス小胞数の減少であるにも関わらず、個々のシナプス機能、シナプス数には変化がないことから、次の可能性として、1) サイレントシナプスの発現 2) 未成熟ニューロン（シナプス）の発現の2点を考えた。

サイレントシナプスは、シナプスが形成されているにも関わらず、情報伝達を正常に行わないシナプスをいい、脳機能の発達過程においてその発現率や、機序が異なることが知られている^{101, 102, 103, 104}。また、脳機能の成熟やシナプス可塑性にも重要な役割を担っている可能性が示唆されている。サイレントシナプスには大きく分類すると2種類が確認されており、1つはpresynaptic silent synapse^{101, 102}、他方はpostsynaptic silent synapseである^{101, 103, 104}。通常、シナプス前終末において伝達物質が充填されたシナプス小胞は、ドッキング、プライミング、膜融合の過程を経て開口放出され（エキソサイトーシス）、その後シナプス前膜から回収され（エンドサイトーシス）、神経伝達物質の再充填を経て、再び開口放出に用いられる（リサイクリング）。この一連の過程には様々な小胞膜タンパク質やシナプス前膜タンパク質が関与している^{105, 106, 107, 108, 109}。presynaptic silent synapseとは、これらのタンパク質の何れかが機能しない、もしくは欠損した結果、開口放出が不可能なシナプスのことである。一方、postsynaptic silent synapseとは、シナプス後膜において、AMPA 受容体が存在せず、NMDA 受容体のみが発現しているシナプスのことである。本研究のここまでの電気生理学的手法を用いた解析では、静止膜電位に相当する-70 mV に膜電位を保持して記録を行っており、NMDA 受容体は細胞外 Mg^{2+} により阻害されているため、postsynaptic silent synapse の関与は解析できない。

そこで、まず、postsynaptic silent synapse の発現率を調べるために、1) 細胞外 Mg^{2+} を除去し、加えて、2) 膜電位を+40 mV に保持することにより、いかなる Mg^{2+} による NMDA 受容体のブロックを解除して、ホールセルパッチクランプ記録を行った。

1) 本項では、パッチクランプ記録中の還流液を以下の組成で実験を行った。

• $1 \times Mg^{2+}$ free 細胞外液

140 mM	NaCl
2.4 mM	KCl
10 mM	HEPES
10 mM	Glucose
4 mM	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$
10 μ M	glycine

*pH は Tris-base を用いて 7.4 に調整した。

細胞外 Mg^{2+} を除去した条件下で、EPSC を記録すると、AMPA 受容体を介したシナプス応答と同時に、NMDA 受容体を介した応答も記録される (図 12A)。NMDA 受容体活性化の特徴は、持続的なチャネル閉鎖期と長い開口期が繰り返されることであり¹¹⁰⁾、NMDA 受容体依存性の EPSC は AMPA 受容体依存性の EPSC と比べて持続時間が長い。そのため、図 12A のような波形が観察され、キネティクスの変化する点 (脱分極刺激後、30–40 ms) で、AMPA 成分、NMDAR 成分をそれぞれ分別できる (図 12A)。結果、3 群間の NMDA/AMPA ratio に有意な差は認められなかった (5w: $n=34$, 0.52 ± 0.02 , 9w: $n=35$, 0.55 ± 0.02 , 16w: $n=0.52 \pm 0.02$, 図 12C)。

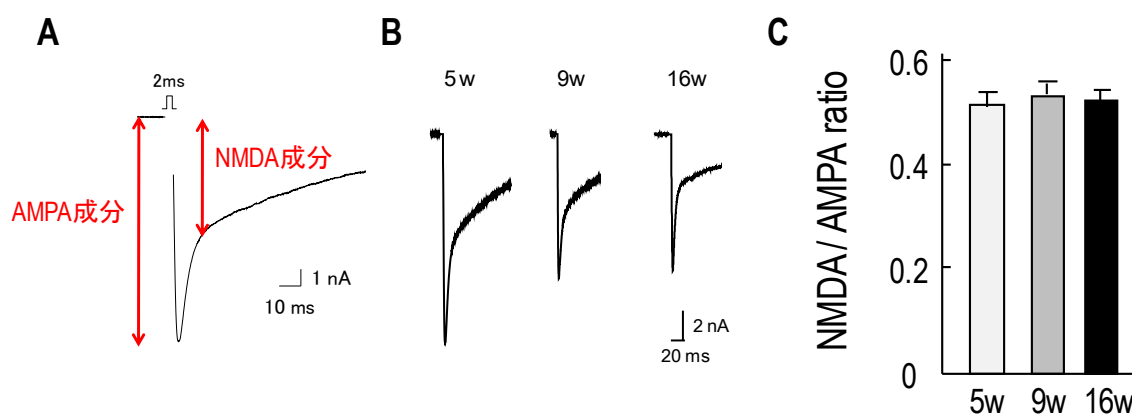


図 12 老化型アストロサイトによる NMDA/AMPA ratio の変化は認められない

2) 本項では、膜電位を+40 mV に保持し、NMDA 受容体に Mg^{2+} ブロックがかからない条件下でパッチクランプ記録を行った。

実験は、薬液投与チューブから、glutamate ($10\ \mu M$) を細胞外から投与した。このとき、電気刺激は与えず、シナプス前終末の開口放出に依存しない NMDA 受容体の応答を記録した (図 13A)。NMDA 受容体の応答を単離するために、CNQX ($10\ \mu M$) で AMPA 受容体を遮断し、glycine ($10\ \mu M$) を添加して NMDA 受容体を活性化した。また、同条件で $0.5\ \mu M$ sucrose を投与して、RRP からの一過性の開口放出を記録した (図 13C)。3 群間で、細胞外 glutamate による NMDA 受容体の応答に差異はなく (5w: $n=64$, 0.65 ± 0.06 , 9w: $n=61$, 0.64 ± 0.05 , 16w: $n=66$, 0.65 ± 0.05 , 図 13B)、前項 1) の結果とあわせて、シナプス後膜の NMDA 受容体、AMPA 受容体がシナプス可塑性に関わる可能性が否定された。

一方、sucrose による NMDA 受容体の応答は、老化型アストロサイトでは低下していた (5w: $n=82$, 1.01 ± 0.13 , 9w: $n=84$, 0.63 ± 0.07 , 16w: $n=81$, 0.64 ± 0.06 , 図 13D, **, $p < 0.01$)。シナプス後膜の NMDA 受容体の密度・感受性には差がないことを考えると、やはり、シナプス前終末の開口放出が低下していることが明らかとなった。

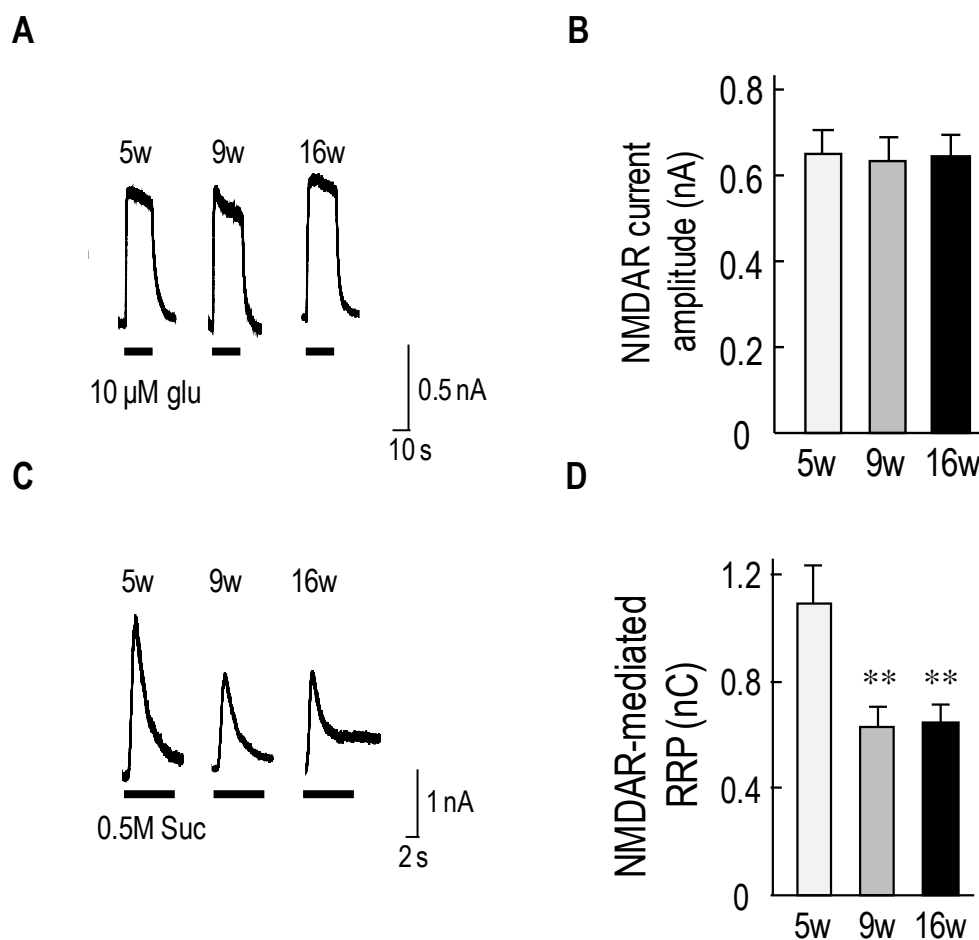
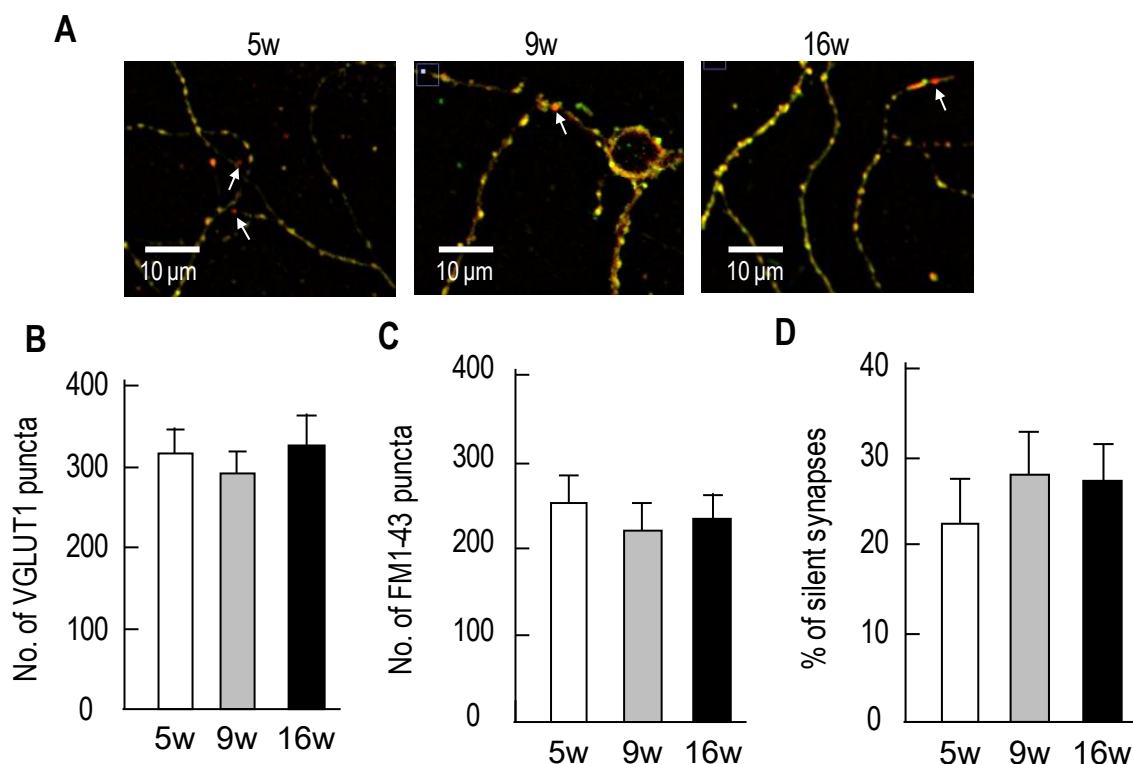


図 13 シナプス伝達低下の機序はシナプス後膜の NMDA 受容体の変化に依存しない

以上の結果から、老化型アストロサイトによるシナプス伝達低下の機序は、postsynaptic silent synapse は関与しないことが示唆された。

次に、presynaptic silent synapse の発現を調べるために、FM1-43FX 蛍光染色を行った。FM1-43FX は細胞膜の染色に用いられる色素であり、その構造は、親水性領域、二重結合領域、疎水性炭素鎖領域に分けられ、親水性領域が正の電荷をもつため、脂質二重膜を透過せず、また、両親媒性で可逆的に膜を染める性質をもつ。

これらの性質を利用して、 K^+ を高濃度（90 mM）に調整した細胞外溶液に FM1-43FX を添加し、高濃度 K^+ による持続的脱分極を誘導しながら開口放出したシナプス小胞に FM1-43FX を取り込ませ、細胞外に残った FM1-43FX を洗い流すことで、アクティブシナプスを選択的に染色することができる。実験は、小胞性タンパク質である vGlut1 (green) と、FM1-43FX (red) の二重染色を行った（図 14A）。前述の結果と同様に、vGlut1 抗体陽性シナプス数に有意な差はなく（5w: $n=27$, 314.07 ± 28.08 , 9w: $n=20$, 288.58 ± 25.53 , 16w: $n=22$, 323.82 ± 34.82 , 図 14B）FM1-43FX で染色されたシナプス数にも有意な差はなかった（5w: $n=27$, 249.0 ± 27.67 , 9w: $n=20$, 216.95 ± 28.50 , 16w: $n=22$, 231.46 ± 25.28 , 図 14C）。また、これらから算出できるサイレントシナプスの発現率にも 3 群間で有意な差は認められなかった（5w: $n=27$, $22.11 \pm 4.81 \%$, 9w: $n=20$, $27.75 \pm 4.71 \%$, 16w: $n=22$, $27.12 \pm 3.84 \%$, 図 14D）。



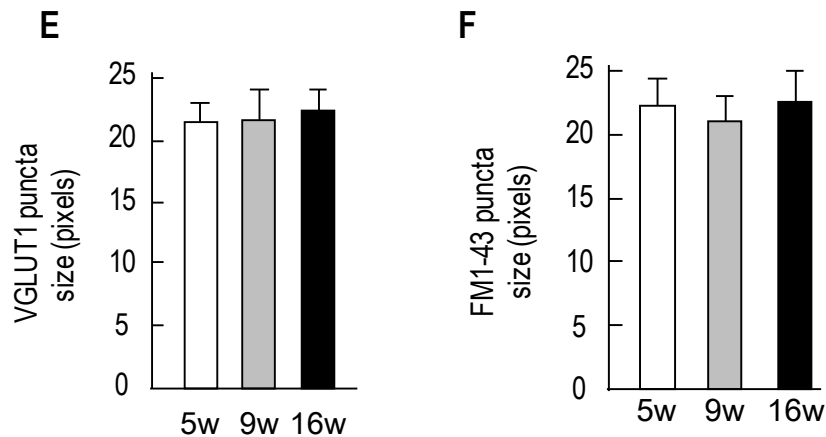


図 14 老化型アストロサイトによるサイレントシナプスの発現率に変化はない

これらの結果から、老化型アストロサイトによるシナプス伝達低下の機序には、エンドサイトーシス障害ならびに presynaptic silent synapse は関与していないことが明らかとなった。

さらに、エキソサイトーシス障害に関する検討を行った。エキソサイトーシスに関わるタンパク質には、シナプス前終末の active zone を構成する Bassoon, piccolo, Munc13, RIM1, ELKS など多数あるが^{105, 106, 107, 108, 109}、本項では active zone 特異的タンパク質の 1 つである Bassoon の発現を定量した^{106, 107}。active zone 特異的タンパクは、シナプス前終末の active zone における開口放出に必要な分子（VAMP, シナプトブレビン, SNAP-25, シンタキシンなど）を制御する役割を担う。

老化アストロサイトによるシナプス伝達低下と Bassoon との関連を調べるために、小胞性タンパク質である vGlut1 (red) と、Bassoon (green) の二重染色を行った（図 15A）。結果は、3 群間での Bassoon 発現に差異は見られず（図 15B-E）、Bassoon の関与も否定された。

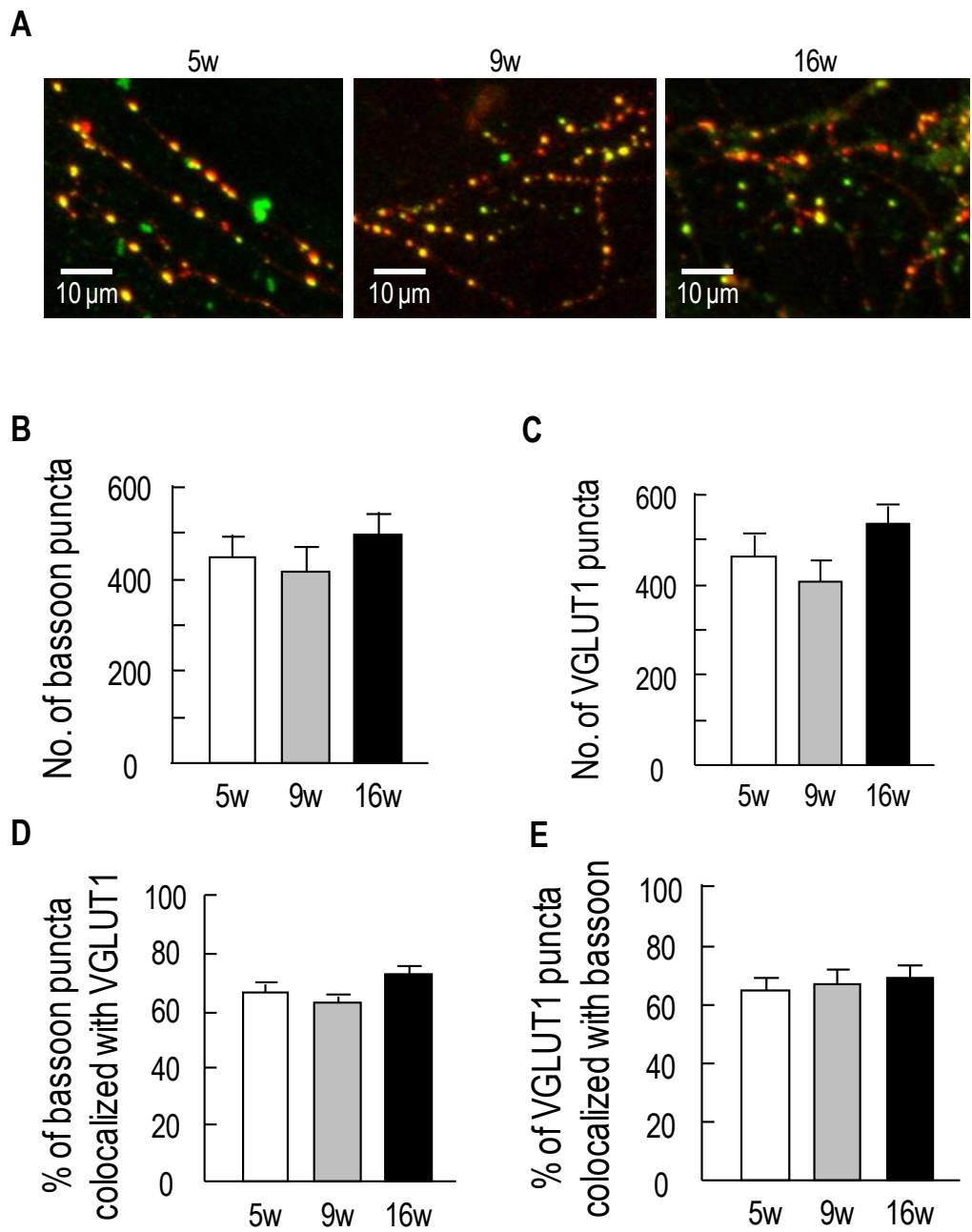


図 15 老化型アストロサイトによるシナプス伝達低下に Bassoon の発現量は関与しない

2-3-2 興奮性シナプスの発達過程におけるシナプス伝達様式の変化に関する検討

これまでの検討により、老化アストロサイトによるシナプス伝達低下には、不活性シナプスの発現率は関与しないと結論できた。

最後に、未成熟シナプスに関する検討を行った。免疫染色によるニューロンの形態的特徴が未成熟ニューロンの形態を示しており、また、アストロサイトでも合成される神経栄養因子である脳由来神経栄養因子 (BDNF) やグリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) はニューロンの発達過程において重要な役割を果たしており、これらは老化によって発現量が低下することが報告されている¹¹¹⁾。さらに、アルツハイマー病モデル老化ラットに BDNF を脳室内投与すると、学習障害や記憶障害を改善することも報告されており¹¹²⁾、老化型アストロサイトと、シナプスの成熟には密接な関わりがあると考えられている。

本項では、未成熟ニューロンとして、培養 7-9 日の海馬ニューロンの電気生理学的手法を用いたシナプス解析を行い、成熟ニューロン (培養 13-15 日) との比較を行った。結果は、未成熟ニューロンでは、EPSC amplitude の低下 (Ctrl: $n=123$, 5.66 ± 0.33 nA, Immature: $n=92$, 2.37 ± 0.21 nA, 図 16A, ***, $p < 0.0001$) , RRP におけるシナプス小胞数の減少 (Ctrl: $n=54$, 11262 ± 851 vesicles, Immature: $n=56$, 2673 ± 303 vesicles, 図 16B, ***, $p < 0.0001$) が起こり、そのメカニズムにシナプス後膜の受容体の密度・感受性は関与していなかった (図 16C)。

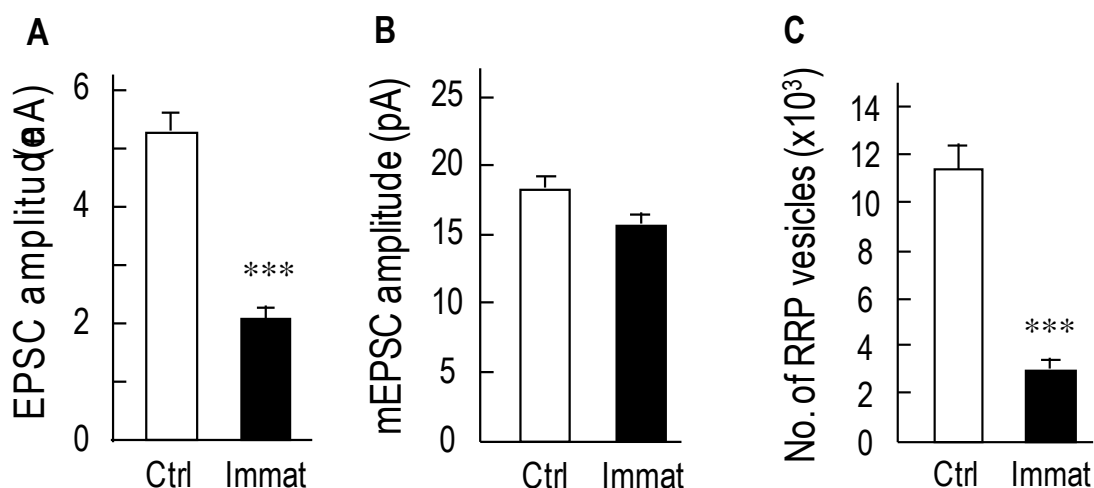


図 16 未成熟ニューロンでは、シナプス前終末におけるシナプス伝達の脆弱が見られた

以上、老化アストロサイトによるシナプス伝達の低下に関する詳細な検討を行ってきた。そのメカニズムはシナプス前終末におけるシナプス小胞数の減少であることが明らかとなり、ニューロンの形態が未成熟であることが分かった。電気生理学的手法によるシナプス解析の結果、老化型アストロサイトによるシナプス伝達低下は、未成熟ニューロン

(immature neuron) のシナプス伝達様式と酷似した結果が得られた。詳細な分子機構の変化は未だ不明な点が多いが、少なくとも、アストロサイトが老化することで、ニューロンの発達に関わる何らかの分子機構の低下もしくは欠損が起こる可能性が示唆された。

3. 考察

本章では、5 週間培養アストロサイトを基準として、9 週間培養、16 週間培養のアストロサイトを『自然老化型アストロサイト』とし、自然老化アストロサイトーニューロン相互作用の解析を行った。老化促進モデルマウスを用いた研究では、樹状突起の後退、スパインの減少、シナプスの減少といった神経ネットワークにおける機能低下^{113, 114, 115, 116)}、また異常行動や記憶学習の低下といった行動学的解析による差異^{117, 118, 119, 120)}、さらには、ニューロン核内の DNA 損傷¹²¹⁾、細胞質内のユビキチン化封入体の蓄積の増加¹²²⁾といった組織学的解析による機能低下が報告されている。しかし、これらの研究はマウス脳内の神経ネットワークにおける全ての変異が統合されて現れた機能障害であるため、アストロサイトの老化によるシナプス機能修飾作用に関する詳細なメカニズムの解析は困難である。そこで、本研究では、脳内で最も多く存在するアストロサイトとニューロンの相互作用に絞って、さらには、単一ニューロン培養法による *in vitro* 研究を行った。近年の研究では、アストロサイトの脳機能構築における役割が見直され、老化や病態におけるシナプス伝達機能の変異は、ニューロンの障害だけではなく、アストロサイトの機能低下により制御されていることが明らかになり^{22, 23, 123)}、本研究は、脳の老化におけるアストロサイトの役割の解明において意義のあるものである。

老化アストロサイトの β -galactosidase 染色の結果、9 週間以上アストロサイトを培養しても、細胞老化の促進を検出できず、またアストロサイトの老化に伴い GFAP の発現が上昇することが知られているが^{124, 125, 126)}、9 週間培養以上ではこの差異も認められなかった (data not shown)。共培養したニューロンに与えるシナプス機能修飾作用に関しても、9 週間、16 週間培養アストロサイトでは有意な差が認められなかった。しかし、ニューロンの形態に関する解析においては、アストロサイトの培養期間に伴って、樹状突起の空間的な広がりが抑制されることを示唆する結果が得られたが、これらの結果がニューロンの機能に与える影響は不明である。老化型アストロサイトにおけるシナプス伝達低下の特徴として、免疫染色の結果からシナプス数の変化が見られなかったにも関わらず、RRP におけるシナプス小胞数の減少が認められる結果が得られた。形態学的な特徴と併せると、ニューロンの成熟な関わる何らかの変異が生じた可能性が考えられたため、本節 2-3 ではサイレントシナプスの発現を検討した。サイレントシナプスの発現には、発達や成熟過程における脳機能の構築においての意義が報告されており、ニューロンの発達過程においては、形成期で無造作にシナプスを形成して神経発火を惹起し、成熟期では機能的なシナプス除去とシナプス強化を経て同期的神経活動パターンを形成すると考えられており、発達初期においては、シナプスとしての伝達物質放出機能が備わっていないサイレントシナプスが多く形成されている。*in vivo* 実験においても、脳内の神経ネットワークの形成やシナプスの発達には単に遺伝子によって決定付けられているのではなく、外的刺激が制御していることが知られており、感受性の高い臨界期にサイレントシナプスが活性化型になることが報告

されている。その過程には BDNF が関与しており、ノックアウトマウスを用いた研究では、野生型マウスと比較して、サイレントシナプス発現率は有意に高いことが明らかとなっている。また、老化によるアストロサイト由来の BDNF 産生量の減少や^{97,98)}、サイレントシナプスの発現を制御していることが報告されている、Thrombospondins (TSP) の産生にも老化が関与することが示唆されており^{99,100)}、本研究においても、サイレントシナプスの発現が関与する可能性が考えられた。しかし、電気生理学的解析、免疫組織学的解析において、老化型アストロサイトではシナプス前性、シナプス後性の何れにおいてもサイレントシナプスの発現率に変化は認められなかった。さらに、アクティブゾーンを構成するタンパク質である Bassoon の発現量にも有意な差は認められず、本研究で行った検討においては、老化アストロサイトが誘導するシナプス伝達脆弱化の機序の詳細な解明には至らず、老化と神経ネットワークの変性に関連性を解明するには、さらにターゲットを絞った網羅的な検討を行う必要がある。

第3章 $A\beta_{1-40}$ 慢性暴露による興奮性シナプス伝達の低下作用

第1章では、アストロサイトに $0.5\ \mu\text{M}$ $A\beta_{1-40}$ を慢性暴露すると、細胞老化が促進することを明らかとした（『異常老化』と定義した）。第2章では、時系列変化に伴う老化（『自然老化』と定義した）が促進したアストロサイトによって、共培養したニューロンのシナプス伝達が低下することを明らかとした。

$A\beta$ が原因で発症すると考えられているアルツハイマー病の患者の大多数は高齢者であり、老化とアルツハイマー病には密接な関わりがあると考えられている。これまでの研究では、アルツハイマー病患者の脳内では、 $A\beta$ が凝集・蓄積し（老人斑）、これに伴い、海馬や前頭葉などの脳部位で神経細胞死、神経細胞脱落が生じることで脳が委縮し、認知機能障害などの症状が発現することが明らかとなっている³³⁾。また、*in vitro* 研究においても高濃度の $A\beta$ が興奮性シナプス伝達を抑制すること、 $A\beta$ の濃度や重合度により作用が異なること^{59, 60, 61)}、アミノ酸残基の異なる $A\beta$ の組成比に依存する作用があることなどが報告されている^{42, 43, 44, 45)}。近年、アルツハイマー病に関して、ニューロン-アストロサイト相互作用に着目してシナプス病態を解析した研究が着目されてきているが、これらの研究では脳の老化との関連性が未解明である。そこで、本章では、第1節でニューロン-アストロサイト相互作用における $A\beta_{1-40}$ のシナプス機能修飾作用を脳の老化概念に基づいて検討し、第2節では、 $A\beta_{1-40}$ によるアストロサイト老化促進作用がシナプス伝達、シナプス形成に及ぼす影響を検討した。

第1節 オータプス培養標本に $0.5\ \mu\text{M}$ $A\beta_{1-40}$ を慢性暴露すると興奮性シナプス伝達が低下した

1 実験材料ならびに実験方法

1-1 実験動物

本項に用いた実験動物は第1章 1-1 と同様の ICR 系統マウスである。

1-2 実験方法

1-2-1 オータプス培養標本の作製手順

①第2章 第1節 1-2-1 の手順と同様の方法でオータプス培養標本を作製した。

②第1章 1-2-2 と同様の方法で $A\beta_{1-40}$ を調整し、ニューロン培養後 11-12 日目に $0.5\ \mu\text{M}$ になるように添加し、3 日後の DIV 14-15 にシナプス解析を行った。

1-2-2 ホールセルパッチクランプ法を用いたシナプス解析

第2章 1-2-2 と同様の方法で行った。

1-2-3 vGlut1, MAP2 染色によるニューロン形態およびシナプス形成の解析

第2章 1-2-3 と同様の方法で行った。

1-3 統計処理

2 群間の統計処理には、Student's t-test を使用した。

2 実験結果

2-1 $A\beta_{1-40}$ 慢性暴露によるニューロン-アストロサイト相互作用に基づく興奮性シナプス伝達修飾作用に関する検討

ニューロン培養期間が DIV 11-12 のオータプス培養標本に $A\beta_{1-40}$ (0.5 μ M、3 日間) を慢性暴露した標本を用いて、ホールセルパッチクランプ法を用いてシナプス解析を行った。 $A\beta$ 群では EPSC amplitude が有意に減少した (Ctrl; $n=135$, 6.32 ± 0.37 nA, $A\beta$; $n=137$, 4.17 ± 0.32 nA, 図 17A, B)。この結果から、オータプス培養細胞に $A\beta_{1-40}$ を慢性暴露することでシナプス伝達の脆弱化が起こることが明らかとなった。

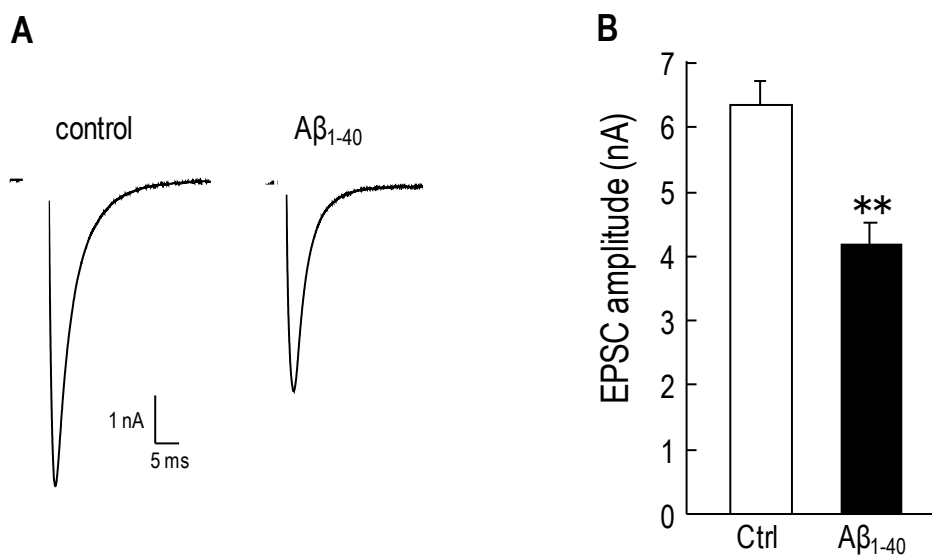


図 17 $A\beta_{1-40}$ 慢性暴露により興奮性シナプス伝達が低下する

次に、テトロドトキシン (TTX, 0.5 μ M) 存在下で、mEPSC を記録した (実験方法参照)。
2 群間で mEPSC amplitude (Ctrl; n=119, 19.7 ± 0.50 pA, $A\beta$; n=126, 19.2 ± 0.53 pA, 図 18C)、mEPSC frequency には有意な差が認められなかった (Ctrl; n=119, 4.59 ± 0.30 Hz, $A\beta$; n=126, 3.59 ± 0.31 Hz, 図 18B, **, $p < 0.01$)。mEPSC の解析結果から $A\beta_{1-40}$ による興奮性シナプス伝達の低下はシナプス前細胞の開口放出、もしくはシナプス後細胞の AMPA 受容体の密度や感受性の変化を伴うものではないことが示唆された。

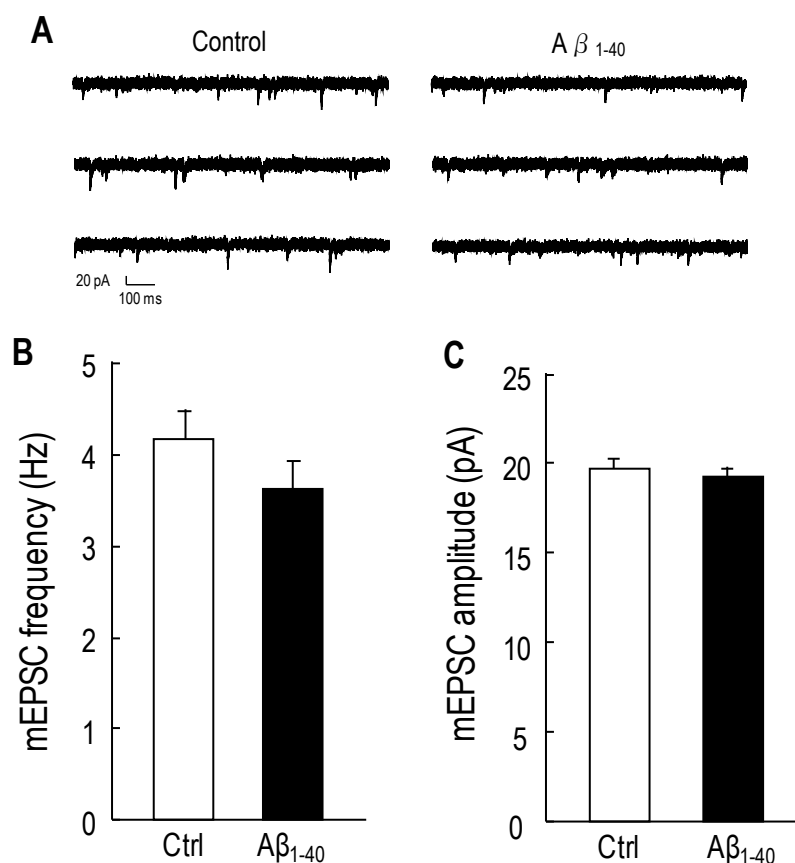


図 18 $A\beta_{1-40}$ は mEPSC には影響しない

さらに詳細な機序を解析するために、RRP におけるシナプス小胞数の測定、また、Pvr、Paired-pulse ratio の測定によるシナプス前終末の解析を行った。結果は、 $A\beta$ 群において RRP におけるシナプス小胞数が有意に減少したが (Ctrl; n=117, 21740 ± 1867 , $A\beta$; n=124, 16201 ± 1605 , 図 19A, *, $p < 0.05$)、Pvr、PPR には差がなかったことから (Pvr: Ctrl; n=132, 4.36 ± 0.32 %, $A\beta$; n=135, 4.22 ± 0.41 %, PPR: Ctrl; n=62, 1.03 ± 0.02 , $A\beta$; n=65, 1.09 ± 0.03 図 19B, C)、 $A\beta$ 群でのシナプス伝達の低下は、シナプス前終末の放出機構や Ca^{2+} 感受性などには影響せず、シナプス小胞数の減少であることが示唆された。

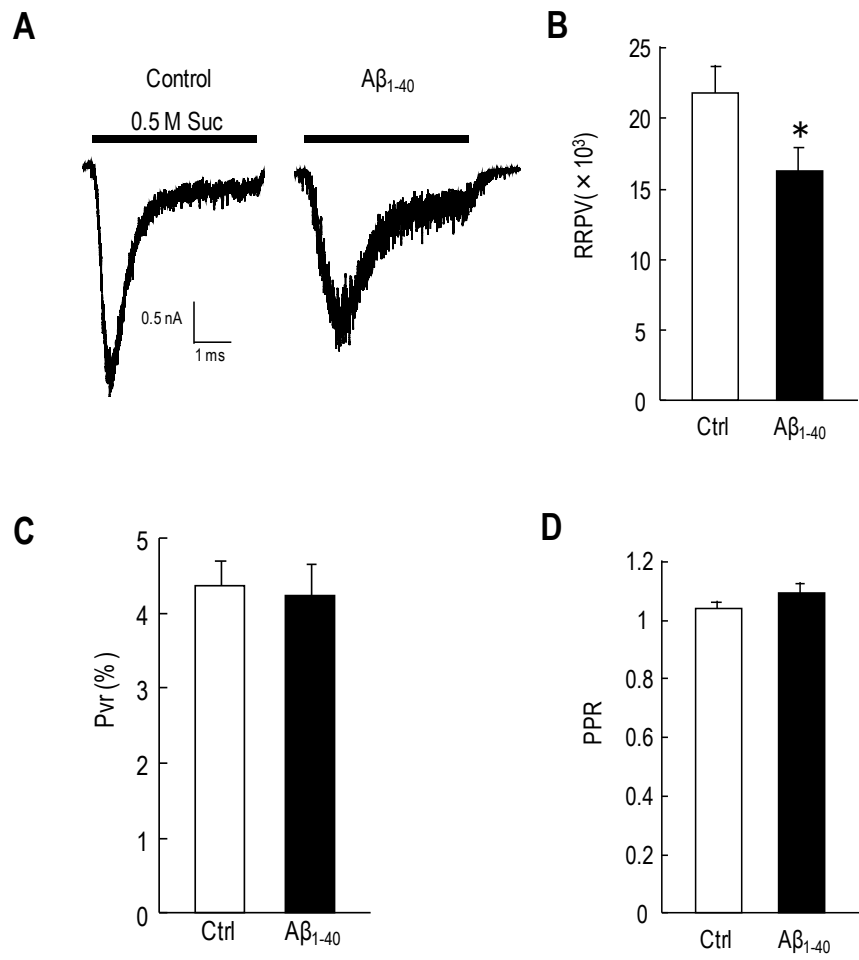
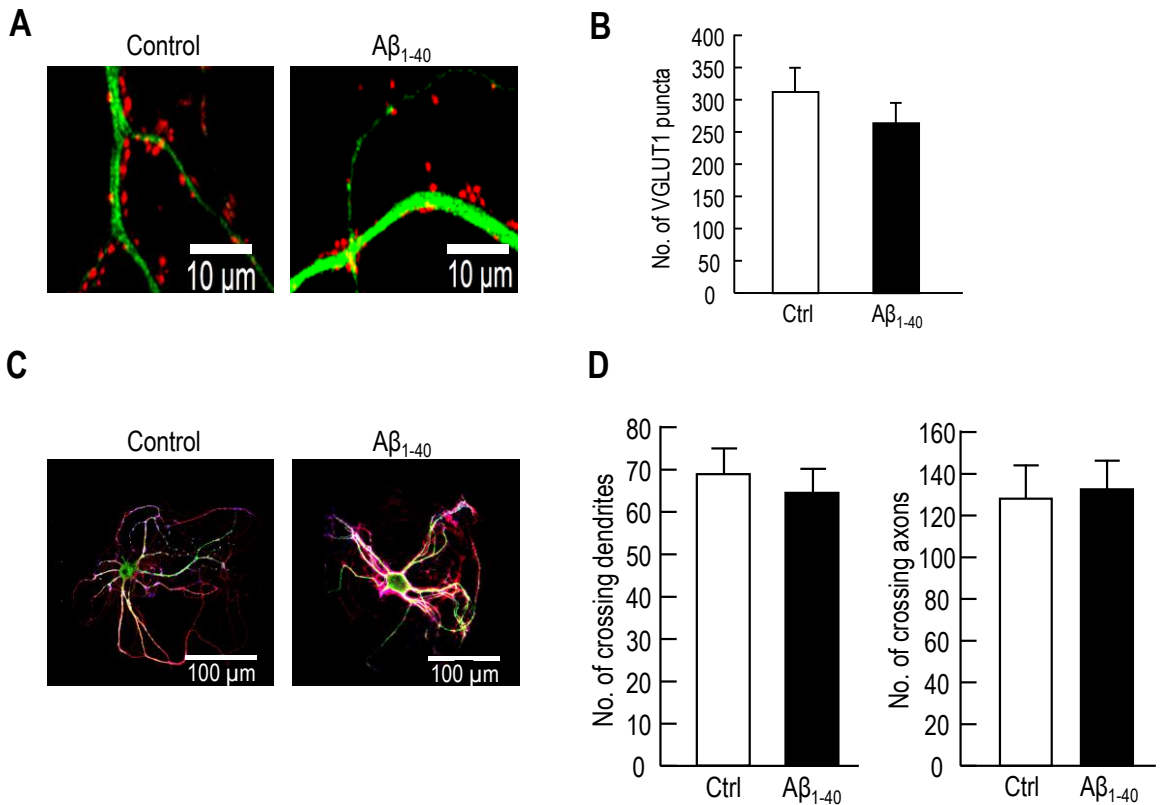


図 19 $A\beta_{1-40}$ により RRP におけるシナプス小胞数が減少する

2-2 興奮性シナプスの形態に対する $A\beta_{1-40}$ の影響に関する検討

RRP におけるシナプス小胞数減少の原因がシナプス数の減少に起因するのかを検討するために、免疫染色法を用いて実験を行った。興奮性シナプスのマーカーとして小胞型グルタミン酸トランスポーター (vGlut1)、ニューロンの形態を同時に観察するために樹状突起のマーカーである microtubule associated protein 2 (MAP2)、軸索のマーカーとして tau 蛋白を用いて三重染色を行った(図 20A, C)。結果、総シナプス数は変化しなかった(Ctrl; $n=31$, 311.5 ± 36.3 , $A\beta$; $n=31$, 261.9 ± 31.3 , 図 20B)。ニューロンの形態に関する解析は第 2 章 2-2 と同様の方法で行った。樹状突起、軸索の総分岐点には有意な差は認められず、(No. of crossing dendrites: Ctrl; $n=31$, 68.5 ± 6.07 , $A\beta$; $n=31$, 64.3 ± 5.37 , No of crossing axons: Ctrl; $n=31$, 127.2 ± 15.8 , $A\beta$; $n=31$, 132.0 ± 13.3 , 図 20D)、また、分岐点にも差異は認められなかった (Peak point of dendritic crossings: Ctrl; $n=31$, 50.0 ± 6.80 , $A\beta$; $n=31$, 70.2 ± 8.64 , Peak point of axonal crossings: Ctrl; $n=31$, 59.2 ± 7.32 , $A\beta$; $n=31$, 45.3 ± 4.69 , 図 20E)。



E

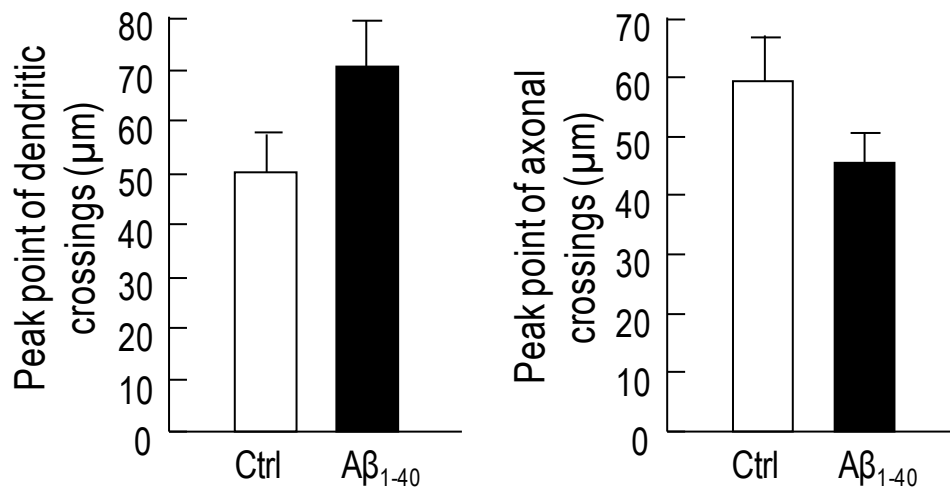


図 20 Aβ₁₋₄₀ はシナプス数、ニューロンの形態の変化には影響を及ぼさない

以上の結果から、オータプス培養標本に Aβ₁₋₄₀ を慢性暴露すると、シナプス数、ニューロン形態には影響を与えないが、興奮性シナプス伝達を低下させることが明らかとなった。この脆弱化の作用は、シナプス前終末における RRP サイズの減少であることが示唆された。第 1 章の結果から、0.5 μM Aβ₁₋₄₀ 慢性暴露は、アストロサイトの老化を促進することが確認されており、老化とアルツハイマー病との何らかの関係を反映している可能性が考えられる。

本来、アストロサイトは Aβ の除去作用を有しており、正常な脳内では神経保護的に作用するが、その作用は老化に伴い低下することも報告されている。ヒトの脳内では、若年期から Aβ の産生が行われ、老化により Aβ 産生能が除去機能よりも上回ることで Aβ の過剰な蓄積が起これと考えられている。しかし、本項で用いた標本は、ニューロンとアストロサイトを共培養しているため、ともに Aβ₁₋₄₀ の影響下にあるため、シナプス伝達の低下にアストロサイトの変性を介した作用が影響しているのかは不明である。

この問題を解決するためには、次節で述べるアストロサイトのみが Aβ₁₋₄₀ の暴露を受けたオータプス培養標本作製することにより検討した。

第2節 0.5 μ M $A\beta_{1-40}$ 慢性暴露による異常老化アストロサイトと共培養したニューロンにおける興奮性シナプス伝達の低下作用

2-1 $A\beta_{1-40}$ 慢性暴露により老化促進したアストロサイトにおける $A\beta_{1-40}$ 除去後の老化維持に関する検討

前節では、ニューロンとアストロサイトを共培養した環境下で $A\beta_{1-40}$ を慢性投与したため、 $A\beta_{1-40}$ のシナプス修飾作用が、ニューロンへの直接作用と、アストロサイトを介した間接作用を区別することが困難であった。そこで、本節では、アストロサイトのみに $A\beta_{1-40}$ を慢性暴露し、 $A\beta_{1-40}$ に直接的な暴露のないニューロンのシナプス解析を行うことで、 $A\beta_{1-40}$ のアストロサイト異常老化を介した、ニューロンへの直接作用を解析することを試みた。本節では、下図のような培養方法によりオータプス標本作製した。

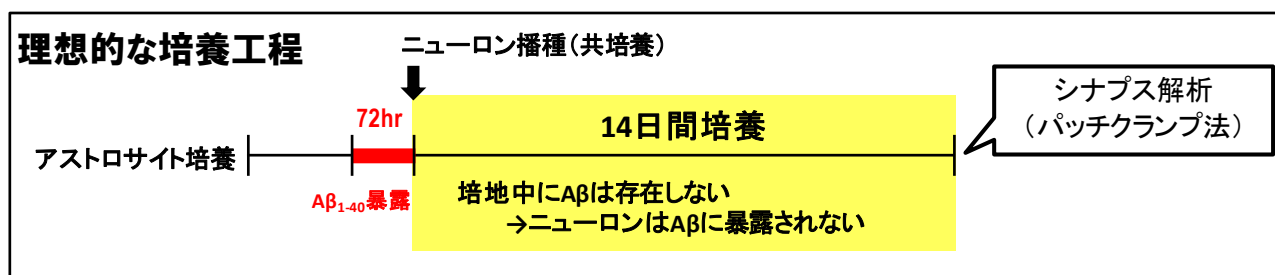


図 21 $A\beta_{1-40}$ の暴露を受けたアストロサイトと、暴露を受けていないニューロンを共培養させた標本の作製手順

この工程では、シナプス解析を行うためのニューロン培養期間として 14 日間が必要となるため、 $A\beta_{1-40}$ の老化促進作用が、除去後も 14 日間維持されるのかを検討しなければならない。検討には、第 1 章と同様に β -galactosidase 染色法を用いた。本検討では、 $A\beta_{1-40}$ 除去後 3 日、7 日、14 日の培養アストロサイトを同時染色した。

結果は、 $A\beta_{1-40}$ によるアストロサイトの老化促進作用は、 $A\beta_{1-40}$ 除去後 3、7、14 日の各時点において維持されていた (Ctrl (N=9): 3 days; 1.61 ± 0.17 , 7 days; 1.87 ± 0.16 , 14 days; 1.48 ± 0.01 , $A\beta_{1-40}$ (N=9): 3 days; 2.39 ± 0.14 , 7 days; 2.55 ± 0.18 , 14 days; 2.29 ± 0.18 , 図 22A, C)。また、同時に DAPI 染色も行ったが、 $A\beta_{1-40}$ によるアストロサイトの細胞数への影響は認められなかった (Ctrl (N=9): 3 days; 365 ± 34.9 , 7 days; 376 ± 35.6 , 14 days; 350 ± 34.1 , $A\beta_{1-40}$ (N=9): 3 days; 402 ± 38.9 , 7 days; 401 ± 32.2 , 14 days; 360 ± 27.6 , 図 22 B, D)。以上の結果から、先述した工程で培養を行うと、 $A\beta_{1-40}$ に暴露されて異常老化が促進したアストロサイトと、 $A\beta_{1-40}$ には全くさらされていないニューロンが共培養されたオータプス標本の作製が可能であると結論した。以下の実験は、この標本を用いて、 $A\beta_{1-40}$ によるアストロサイトを介した間接的なシナプス修飾作用の解析を行った。

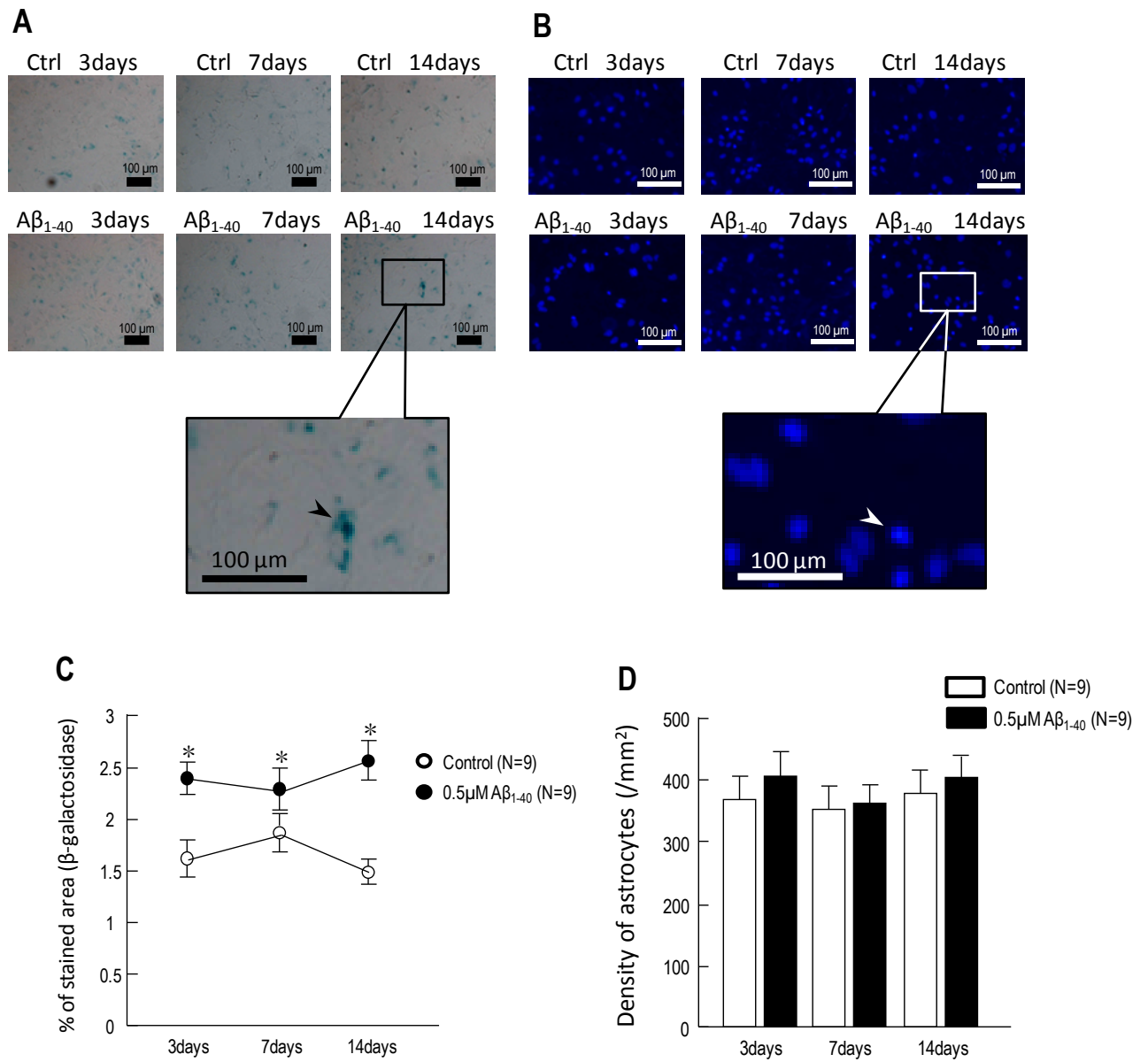


図 22 $A\beta_{1-40}$ 慢性暴露によるアストロサイトの老化促進作用は $A\beta_{1-40}$ 除去後 14 日経っても維持されている

2-2 異常老化したアストロサイトと共培養したニューロンの興奮性シナプス伝達修飾作用に関する検討

まず、EPSC amplitude を記録したところ（図 23A）、 $A\beta$ 群においては有意に低値を示した（Ctrl; $n=92$, 9.66 ± 0.56 nA, $A\beta$; $n=90$, 7.33 ± 0.52 nA, 図 23B, **, $p<0.01$ ）。このことから、 $A\beta_{1-40}$ にはアストロサイトの老化促進を介した間接的な興奮性シナプス伝達低下作用があることが示唆された。

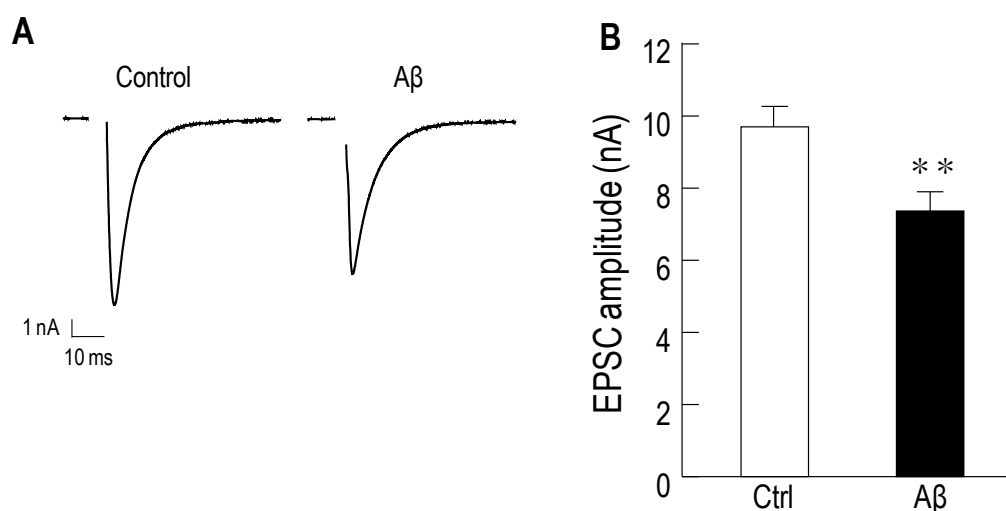


図 23 $A\beta_{1-40}$ により異常老化が生じたアストロサイトと共培養したニューロンは興奮性シナプス伝達が低下する

次に、mEPSC を記録した（図 24A）。2 群間で mEPSC amplitude には有意な差は認められなかったが（Ctrl; $n=85$, 21.0 ± 0.81 pA, $A\beta$; $n=81$, 20.1 ± 0.74 , 図 24C）、 $A\beta$ 群においては、mEPSC frequency が有意に減少した（Ctrl; $n=85$, 5.14 ± 0.40 Hz, $A\beta$; $n=81$, 3.99 ± 0.35 Hz, 図 24B, *, $p<0.05$ ）。このことから、 $A\beta_{1-40}$ による興奮性シナプス伝達低下作用には、シナプス後細胞ではなく、シナプス前細胞が関与していることが示唆された。

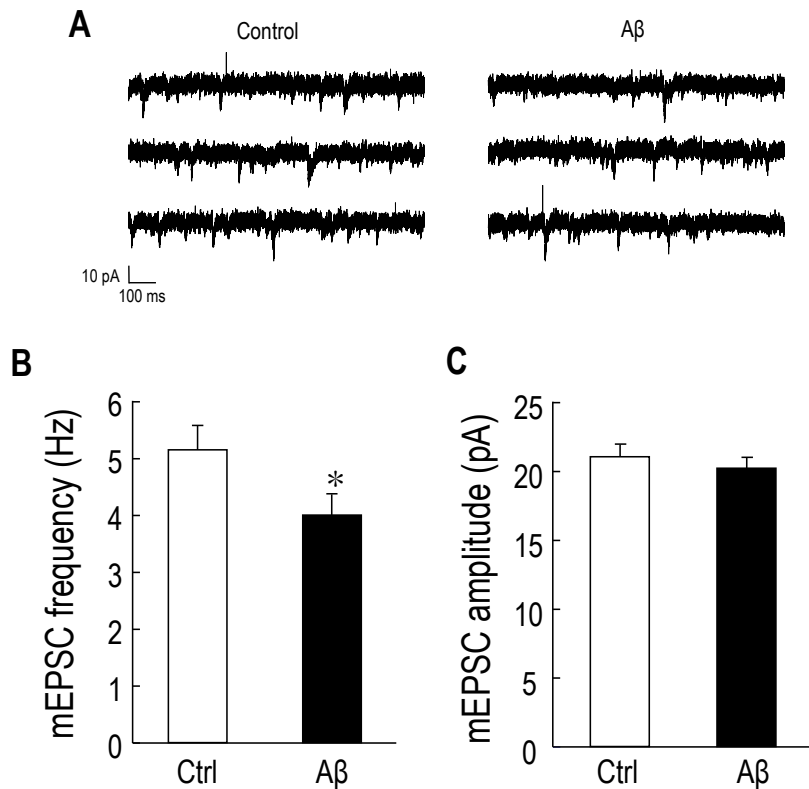


図 24 $A\beta_{1-40}$ の間接作用によるシナプス修飾作用はシナプス前終末が関与する

以上、本節の結果から、 $A\beta_{1-40}$ のシナプス修飾作用には、アストロサイトの老化促進作用を介した間接作用も存在することが明らかとなった。その作用はシナプス前終末におけるシナプス伝達低下が関与していることが示唆される結果が得られた。

次に、0.5 M sucrose 応答を記録し、RRP におけるシナプス小胞数を測定したが、 $A\beta_{1-40}$ 群では有意に減少しており (Ctrl; $n=85$, 25470 ± 2015 , $A\beta_{1-40}$; $n=81$, 15315 ± 1378 , ***, $p < 0.0001$, 図 25)、シナプス形成に関わる変異が生じている可能性がある。また、同ニューロンで Pvr を測定したが、 $A\beta_{1-40}$ 群ではシナプス伝達確率が増加していることが示唆される結果が得られた (Ctrl; $n=92$, 4.61 ± 0.34 , $A\beta_{1-40}$; $n=90$, 5.92 ± 0.48 , *, $p < 0.05$, 図 26)。

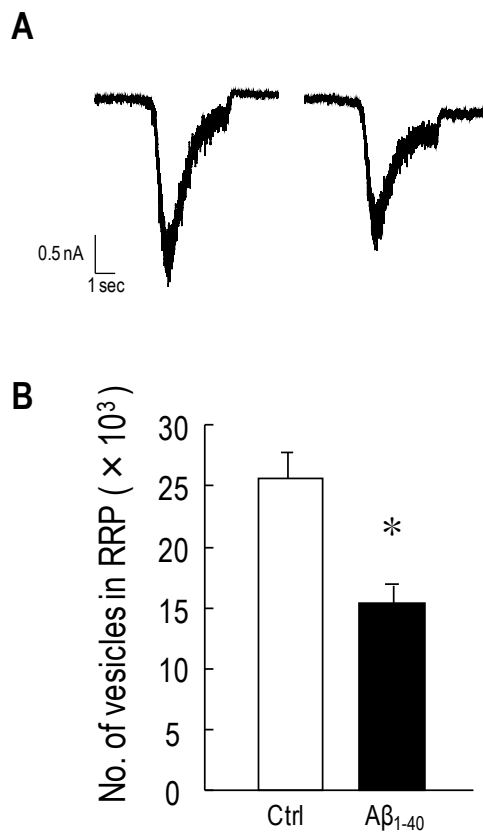


図 25 A β_{1-40} により RRP におけるシナプス小胞数が減少する

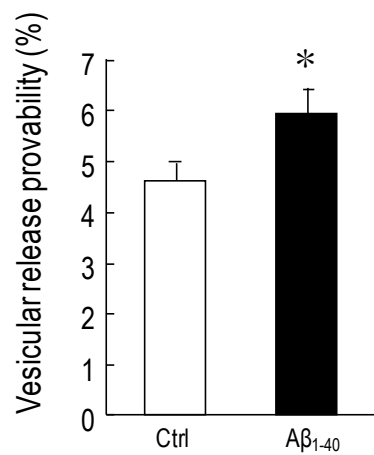


図 26 A β_{1-40} によりシナプス伝達確率が増加する

ここまでの結果から、 $A\beta_{1-40}$ に慢性暴露されたアストロサイトは、共培養したニューロンに対して、1) シナプス前終末の個々のシナプスにおける伝達機能の亢進、2) シナプス前終末におけるシナプス小胞数の減少を誘導した。1) の機序として、①シナプス前終末におけるシナプス小胞のリサイクリングの亢進、もしくは、②シナプス前終末における神経伝達物質放出に関わる Ca^{2+} イオン感受性の亢進が考えられ、また、2) の機序として③オータプスニューロンにおけるシナプス形成数の減少が考えられた。

まず、①の可能性を検証するために、スクロース連続投与による RRP への充填速度の解析を行った。解析方法は、1 回目のスクロース応答に対して、 Δt 秒 ($\Delta t=0, 1, 2, 4, 8, 16, 30, 60$) 後に投与した 2 回目のスクロース応答の比率を算出することで、RRP への充填割合として評価した。すなわち、1 回目のスクロース投与により RRP における全シナプス小胞から神経伝達物質を放出させ、2 回目のスクロースにより、 Δt 秒間に充填された全シナプス小胞から神経伝達物質を放出させることで、シナプス小胞のリサイクリングが評価できる。図 27A は、 $\Delta t=1, 8, 16, 30, 60$ において記録された典型的な波形を示し、また、図 27B は各 Δt におけるスクロース応答の比率 (2 回目の RRP size / 1 回目の RRP size) を示しており、スクロース投与間隔 (Δt) に応じて RRP への充填比率が増加していることが観察された。Control 群と $A\beta_{1-40}$ 群の各点における比率を比較したが、いずれの点においても有意な差は認められず、 $A\beta_{1-40}$ はシナプス前終末におけるシナプス小胞のリサイクリングには関与しないことが分かった。

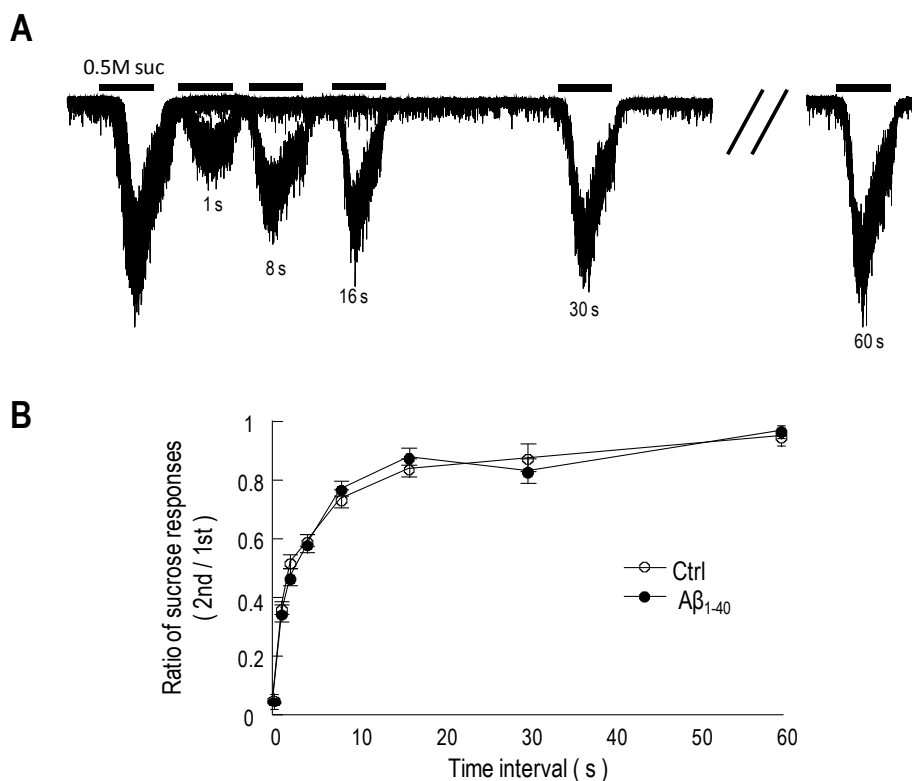


図 27 $A\beta_{1-40}$ はシナプス小胞リサイクリングには関与しない

さらに、②の可能性を検証するために、短時間 (50 ms) 連続刺激を行った。1 回目の刺激により誘導される EPSC の amplitude と、2 回目の刺激による EPSC の amplitude の比率を Paired-pulse ratio (PPR, 2nd EPSC amplitude / 1st EPSC amplitude) といい、一般的に、シナプス前終末における Ca^{2+} 感受性が高いときには、PPR の値が低値を示すことが知られている。2 群間における PPR を比較すると、 $\text{A}\beta_{1-40}$ 群では、Control 群と比較すると有意に低値を示した (Ctrl; $n=92$, 1.12 ± 0.021 , $\text{A}\beta_{1-40}$; $n=90$, 1.05 ± 0.021 , *, $p < 0.05$, 図 28)。

①、②の結果から、 $\text{A}\beta_{1-40}$ 群におけるシナプス伝達機能亢進の機序として、シナプス前終末における Ca^{2+} イオン感受性の亢進が関与していることが明らかとなった。

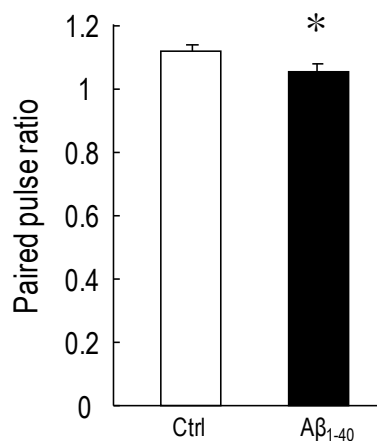


図 28 $\text{A}\beta_{1-40}$ はシナプス前終末における Ca^{2+} イオン感受性を亢進させる

最後に、③の可能性を検証するために、免疫染色法を用いて、各群のオータプスニューロンにおけるシナプス数の定量を行った。結果は、 $A\beta_{1-40}$ 群では Control 群と比較してシナプス数が有意に低値を示した (Ctrl; $n=40$, 448.0 ± 36.02 vesicles, $A\beta_{1-40}$; $n=41$, 336.4 ± 28.47 vesicles, *, $p<0.05$, 図 29)。このことから、 $A\beta_{1-40}$ 群では、個々のシナプス伝達機能が亢進しているが、シナプス形成数が少ないために、全体としてのシナプス伝達物質放出量が有意に減少している可能性が示唆される結果が得られた。

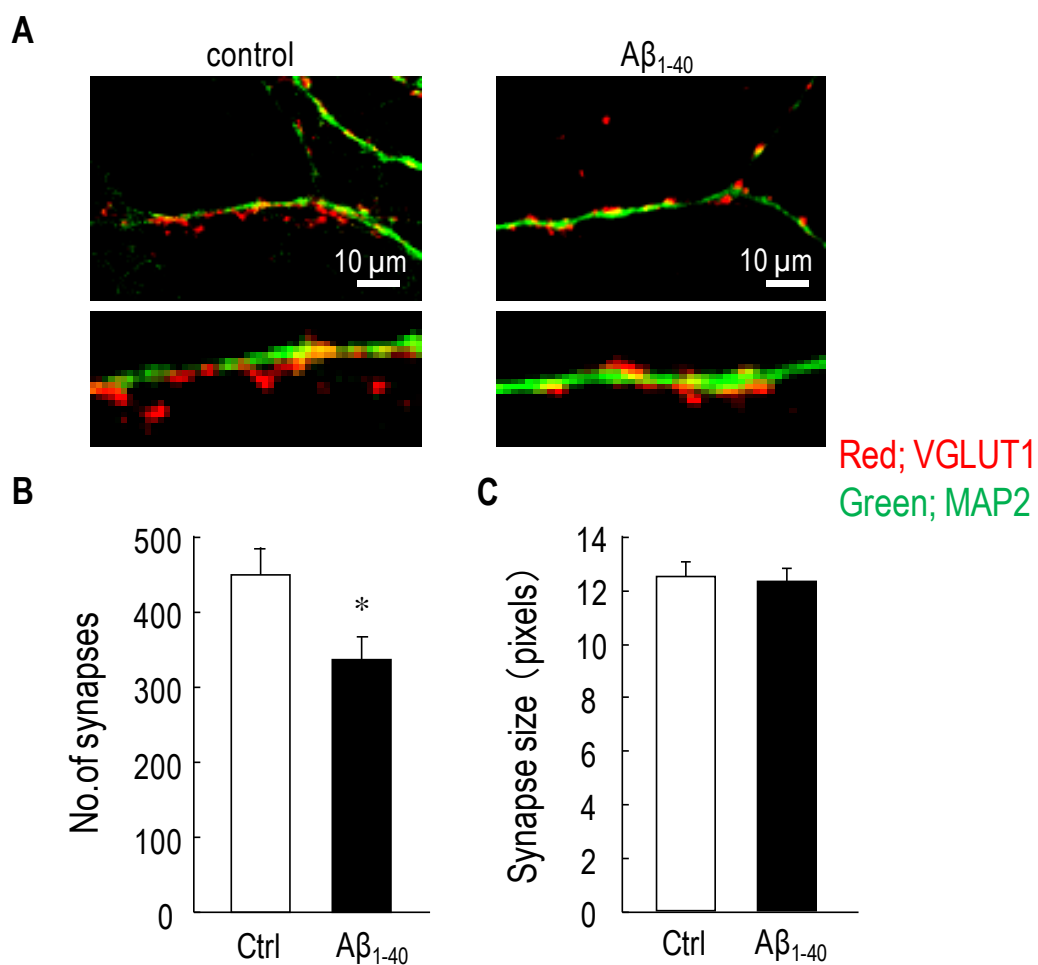


図 29 $A\beta_{1-40}$ はシナプス形成を減少させる

3 考察

本章では、 $A\beta_{1-40}$ によるシナプス伝達修飾作用を 2 つの観点から検討した。第 1 節では、ニューロン成熟後に $A\beta_{1-40}$ を慢性暴露することで単一ニューロン-アストロサイト共培養標本におけるシナプス修飾作用を解析した。第 2 節では、第 1 節での $A\beta_{1-40}$ によるシナプス修飾作用がニューロンへの直接作用だけではなく、アストロサイトの変性を介した間接作用も含まれているのかを検討した。第 1 節では、 $A\beta_{1-40}$ (0.5 μ M、3 日間) を慢性暴露すると、興奮性シナプス伝達が低下することが明らかとなった。この変化には RRP サイズの低下を伴うが、シナプス後膜の受容体に関する差異や、シナプス前終末における Ca^{2+} 感受性などの差異は見られなかった。シナプス小胞数、アクティブシナプス数 (data not shown)、また bassoon 発現量 (data not shown) に関する免疫組織学的解析も行ったが、何れの検討においても $A\beta_{1-40}$ による影響は認められなかった。第 1 章の結果から、本条件での $A\beta_{1-40}$ 暴露は、アストロサイトの老化促進作用があることが確認されており、後述するように、本章におけるシナプス修飾作用への関与を示唆する結果も得られている。老化アストロサイトと共培養したニューロン (以下、老化型とする) を対照群として、同条件で $A\beta_{1-40}$ を老化型に慢性暴露した検討においては、 $A\beta_{1-40}$ によるシナプス修飾作用が消失した (表 1)。

	老化型	老化型+A β	student's t-test
EPSC amplitude	5.11 \pm 0.38 (n=122)	5.23 \pm 0.40 (n=112)	p = 0.822
RRPV	14417 \pm 1352 (n=106)	15618 \pm 1709 (n=106)	p = 0.583

表 1 老化型における $A\beta_{1-40}$ のシナプス修飾作用

この結果は以下の 2 つの可能性を示している。1 つは、 $A\beta_{1-40}$ による作用よりも、老化型アストロサイトのシナプス伝達減少作用の寄与が大きいという可能性である。2 つ目は、アストロサイトが老化したことで、 $A\beta_{1-40}$ 除去機能、もしくはニューロン保護作用が低下し^{66, 67, 68, 69, 70, 71)}、 $A\beta_{1-40}$ のニューロンへの直接作用が強く現れた可能性である。これらの可能性を検討するために、第 2 節ではアストロサイトのみ $A\beta_{1-40}$ を暴露させ、 $A\beta_{1-40}$ がニューロンに直接作用しない環境下で検討を行った。

本検討では、 $A\beta$ によるアストロサイトの老化促進作用が $A\beta$ を除去しても老化が維持していることを応用した⁷⁵⁾。解析結果から、 $A\beta_{1-40}$ にはアストロサイトを介した間接的なシナプス修飾作用が存在することが明らかとなった。 $A\beta_{1-40}$ により、興奮性シナプス伝達が低下し、さらに RRP におけるシナプス小胞数が減少していることが明らかとなり、このとき、シナプス伝達確率が増加していた。現在、その詳細なメカニズムに関する解析には至っていないが、ここまでの結果から、発達が未熟なシナプスが形成されている可能性が考えられた。

本研究室では、オータプスニューロンにおける発達過程におけるシナプス伝達機構の変化に関する研究も行っており、ニューロンの形成過程では、シナプスの総開口放出量が少ないが、シナプス前細胞における伝達確率は亢進している (unpublished data)。この過程には、シナプス形成やサイレントシナプス発現率など様々な要因が関わっているため、さらに詳細

な検討を行う必要がある。また、過去の報告から、アクティブゾーン特異的タンパクである Munc13-1 の活性化は、シナプス前終末のシナプス小胞リサイクリングを亢進し、見かけ上の RRP サイズが小さく見積もられる可能性があることが分かっている¹²⁷⁾。また、本研究室では、家族性 AD の原因遺伝子として同定されたヒト変異型アミロイド前駆体タンパク質 (amyloid precursor protein with Swedish mutation, APP_{Swe}) 遺伝子を導入した Tg2576 マウスを所有しており、*in vivo* 実験では、週齢が進むと認知機能障害や記憶学習障害が発現することが知られているが、*in vitro* 実験においても、長期間培養 (9 週間以上) した Tg2576 マウス的大脑皮質アストロサイトでオートプス培養標本作製すると、5 週間培養では認められなかったシナプス伝達低下が観察された (data not shown)。これらの事実からも、*in vivo*、*in vitro* 研究においてアルツハイマー病と細胞老化には密接な関わりがあることが考えられる。

これらの可能性を踏まえて、さらに詳細なメカニズムが解明されれば、現在では不明な点が多いと言われており、治療満足度が低い疾患、アンメット・メディカル・ニーズの高い疾患の代表例として長く挙げられてきた、アルツハイマー病のメカニズム解明に繋がり、新たな治療戦略の開発が期待される。

総括ならびに結論

本研究の目的は、アルツハイマー病の原因物質の1つである $A\beta$ が、*in vitro* において、脳の老化にどのような影響を及ぼすかを検討し、さらにシナプス伝達機構に与える影響を解析することである。本研究は、3章で構成されており、第1章では、 $A\beta_{1-40}$ がアストロサイトの異常老化促進作用を有することに関する検討を行い、第2、3章では、老化アストロサイトがシナプス伝達、ニューロンの形成に及ぼす影響を、電気生理学的手法、免疫組織学的手法を用いて検討した。

第1章では、アストロサイトに $0.5 \mu\text{M}$ $A\beta_{1-40}$ を72時間慢性暴露させると、細胞老化が促進することが明らかとなった。本条件での $A\beta_{1-40}$ によって促進された老化は炎症を伴わず、細胞死を誘導するものではなかった。通常、*in vitro* においてアストロサイトを長期間培養すると、細胞老化が促進するが、 β -galactosidase 染色法による細胞老化測定においては、9週間以上培養しても老化の促進を検出できない。しかし、 $A\beta$ による老化促進作用は、9週間培養アストロサイトの老化をさらに促進することが確認され、時系列に従った老化と、 $A\beta$ 暴露による老化は、異なるメカニズムでの老化促進作用であることが示唆された。以上のことから、アルツハイマー病患者の脳内では、正常に起こるもの（自然老化）とは区別された異常な老化が生じている可能性があり、このことがアルツハイマー病特有の症状を誘導する原因の1つではないかと考えた。

第2章以降では、アストロサイトの病態に着目してアルツハイマー病における神経変性の解析を試みた。まず、アストロサイトの自然老化が、共培養したニューロンにどのような作用を及ぼすかを検討した。

- 1) 自然老化アストロサイトは共培養したニューロンの興奮性シナプス伝達を低下させ、シナプス前終末の RRP におけるシナプス小胞数の減少が明らかとなった。
- 2) 免疫組織学的解析の結果、総シナプス数には有意な差が認められなかったが、ニューロンの形態が未成熟ニューロンと酷似した特徴を示した。
- 3) ニューロンの発達に関わる、サイレントシナプス発現の検討を行ったが、その発現率には差異がなく、また、アクティブゾーン特異的なタンパク質である bassoon の定量を行ったが、有意な差は認められなかった。

以上の結果から、老化アストロサイトは興奮性シナプス伝達を低下することが明らかとなり、そのメカニズムにはシナプス前細胞の変異に関わることを示唆される結果が得られ

たが、詳細は不明である。アストロサイト由来の液性因子や、アストロサイトが制御しているシナプス伝達に関わる因子の特定、また、シナプス伝達低下に直接関わるタンパク質を同定するためには、さらに網羅的な解析が必要となる。

第3章では、 $A\beta_{1-40}$ のシナプス修飾作用を検討した。第1節では、成熟したオータプス培養標本に $A\beta_{1-40}$ を慢性暴露し、シナプス形成後の $A\beta_{1-40}$ のシナプス修飾作用を解析し、第2節では、その作用にはアストロサイトの異常老化が関与しているのかを検討した。

1) DIV 10-11 の成熟オータプスニューロンに $A\beta_{1-40}$ を慢性暴露すると興奮性シナプス伝達が低下し、シナプス前終末の RRP におけるシナプス小胞数が減少した。

2) 免疫組織学的解析の結果、総シナプス数、ニューロンの形態には有意な差が認められなかった。

3) 老化型培養標本に $A\beta_{1-40}$ を慢性暴露すると、1) で認められたシナプス伝達の低下が消失した。

以上のことから、オータプス培養標本に $0.5 \mu\text{M}$ $A\beta_{1-40}$ を 72 時間慢性させると、興奮性シナプス伝達が低下し、RRP におけるシナプス小胞数が減少することが明らかとなった。この作用は老化アストロサイトによって消失したことから、ニューロンへの直接作用だけではなく、アストロサイトを介した間接作用があることを示唆する結果であった。そこで、第2節では、 $A\beta_{1-40}$ の暴露を受けて異常老化が促進したアストロサイトと、 $A\beta_{1-40}$ には直接暴露されていないニューロンを共培養した標本を用いて、アストロサイトを介した間接的なシナプス修飾作用の解析を試みた。

1) $A\beta_{1-40}$ により異常老化が生じたアストロサイトと共培養したニューロンでは、興奮性シナプス伝達が低下した。この変化は、mEPSC frequency の減少を伴っていた。

2) Pvr、PPR の測定結果から、 $A\beta$ 群では伝達確率が増加していることが明らかとなった。

3) 免疫染色法による解析結果から、 $A\beta$ 群ではシナプス数が減少していた。

以上の結果から、 $A\beta_{1-40}$ によるシナプス修飾作用にはニューロンへの直接的作用だけではなく、アストロサイトへの暴露を介した間接的な作用も存在することが明らかとなった。この作用がアストロサイトの老化促進によるものかは明らかではなく、また、ニューロンへの直接作用を完全に抑えるためには、 $A\beta_{1-40}$ に暴露されたアストロサイトが培地中に $A\beta$

を再び遊離する可能性に関する検討も行わなければならない。

近年、多くの難治性神経変性疾患において、アストロサイトが病態の発症や、進行を制御している可能性に関する検討が行われているが、*in vivo* 研究ではアストロサイトの作用のみを分割して捉える事が困難であり、また、かつては *in vitro* 研究においても病態を反映することが困難であり、病態におけるニューロン-アストロサイト相互作用に関する詳細な機序が不明であった。本研究を含めた、我々のグループでの一連の研究は、老化関連疾患における *in vitro* 研究の重要性を示したものであり、また、応用性の高い実験方法であるため、他の神経変性疾患におけるアストロサイト病態の解明に大いに貢献するものであると考えている。

参考文献

- 1) Sturrock RR. ; A light and electron microscopic study of proliferation and maturation of fibrous astrocytes in the optic nerve of the human embryo. : J Anat. Apr;119: 223-34. (1975)
- 2) Pelvig DP, Pakkenberg H, Stark AK, Pakkenberg B; Neocortical glial cell numbers in human brains. : Neurobiol Aging. Nov; 29 (11):1754-62 (2008)
- 3) Ransom B, Behar T, Nedergaard M. ; New roles for astrocytes(stars at last). : Trends Neurosci;26:520 -522. (2003)
- 4) Chen Y, Swanson RA. ; Astrocytes and brain injury. : J Cereb Blood Flow Metab;23:137 -149. (2003)
- 5) Anderson CM, Nedergaard M. Astrocyte-mediated control of cerebral microcirculation. : Trends Neurosci;26:340 -344; (2003)
- 6) Naoko Kaneko, Oscar Marín, Masato Koike, Yuki Hirota, Yasuo Uchiyama, Jane Y. Wu, Qiang Lu, Marc Tessier-Lavigne, Arturo Alvarez-Buylla, Hideyuki Okano, John L.R. Rubenstein, Kazunobu Sawamoto, New neurons clear the path of astrocytic processes for their rapid migration in the adult brain. : *Neuron*, 67, 213-223 (2010)
- 7) Zhao Y, Rempe DA; Targeting astrocytes for stroke therapy: Neurotherapeutics 7 : 439-451 (2010)
- 8) Naus CC, Ozog MA, Bechberger JF, Nakase T. ; A neuroprotective role for gap junctions. : Cell Commun Adhes., 8(4-6):325-8 (2001)
- 9) Pirttimäki TM, Parri HR. ; Astrocyte plasticity: implications for synaptic and neuronal activity. : Neuroscientist. 2013 Dec;19(6):604-15. (2013)
- 10) Serrano A., Haddjeri N., Lacaille J. C. and Robitaille R. ; GABAergic network activation of glial cells underlies hippocampal heterosynaptic depression. : J. Neurosci. 26, 5370-5382. (2006)

- 11) Nagler K., Mauch D. H. and Pfrieder F. W.; Glia-derived signals induce synapse formation in neurones of the rat central nervous system.: J. Physiol. 533, 665-679. (2001)

- 12) Song H., Stevens C. and Gage F. H.; Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells.: Nature 417, 39-44. (2002)

- 13) Innocenti B., Parpura V. and Haydon P. G.; Imaging extracellular waves of glutamate during calcium signaling in cultured astrocytes.: J. Neurosci. 20, 1800-1808. (2000)

- 14) Hua X., Malarkey E. B., Sunjara V., Rosenwald S. E., Li W. H. and Parpura V.; Ca²⁺-dependent glutamate release involves two classes of endoplasmic reticulum Ca²⁺ stores in astrocytes.: J. Neurosci. Res. 76, 86-97. (2004)

- 15) Krzan M., Stenovec M., Kreft M., Pangrsic T., Grilc S., Haydon P. G. and Zorec R.; Calcium-dependent exocytosis of atrial natriuretic peptide from astrocytes.: J. Neurosci. 23, 1580-1583. (2003)

- 16) Agulhon C., Petravic J., McMullen A. B., Sweger E. J., Minton S. K., Taves S. R., Casper K. B., Fiacco T. A. and McCarthy K. D.; What is the role of astrocyte calcium in neurophysiology?: Neuron 59, 932-946. (2008)

- 17) Angela M. Bruno, Jeff Y. Huang, David A. Bennett, Robert A. Marr, Michelle L. Hastingsd, Grace E. Stutzmann; Altered ryanodine receptor expression in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: Neurobiology of Aging 33 1001.e1-1001.e6. (2012)

- 18) Hama H, Hara C, Yamaguchi K, Miyawaki A; PKC Signaling Mediates Global Enhancement of Excitatory Synaptogenesis in Neurons Triggered by Local Contact with Astrocytes,: Neuron 41, 405-15 (2004)

- 19) Perea, G., Araque, A.; Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses.: Science 317, 1083-1086 (2007)

- 20) Agulhon, C., Fiacco, T. A. & McCarthy, K. D.; Hippocampal short- and long-term

- plasticity are not modulated by astrocyte Ca^{2+} signaling. : Science, 327, 1250-1254 (2010)
- 21) Ballas N, Liou DT, Grunseich C, Mandel G; Non-cell autonomous influence of MeCP2-deficient glia on neuronal dendritic morphology. : Nat Neurosci 12: 311-317. (2009)
- 22) Maezawa I, Swanberg S, Harvey D, LaSalle JM, Jin LW; Rett syndrome astrocytes are abnormal and spread MeCP2 deficiency through gap junctions. ; J Neurosci 29: 5051-5061. (2009)
- 23) Molofsky AV, Krennick R, Ullian E, Tsai HH, Deneen B, et al. ; Astrocytes and disease: a neurodevelopmental perspective. : Genes Dev 26: 891-907. Review. (2012)
- 24) Yankner BA, Duffy LK, Kirschner DA. ; “Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides” . : Science 250 (4978): 279-82. (1990)
- 25) Iijima K, Liu HP, Chiang AS, Hearn SA, Konsolaki M, Zhong Y; “Dissecting the pathological effects of human Abeta40 and Abeta42 in Drosophila: a potential model for Alzheimer’s disease” . : *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (17): 6623-8. (2004).
- 26) Blanchard BJ, Chen A, Rozeboom LM, Stafford KA, Weigele P, Ingram VM; “Efficient reversal of Alzheimer’s disease fibril formation and elimination of neurotoxicity by a small molecule” . : *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (40): 14326-32. (2004)
- 27) Shen ZX; “Brain cholinesterases: II. The molecular and cellular basis of Alzheimer’s disease” . : *Med. Hypotheses* 63 (2): 308-21. (2004)
- 28) Wenk GL; “Neuropathologic changes in Alzheimer’s disease” . : *The Journal of clinical psychiatry* 64 Suppl 9: 7-10. (2003)
- 29) Schmitz C, Rutten BP, Pielen A; “Hippocampal neuron loss exceeds amyloid plaque load in a transgenic mouse model of Alzheimer’s disease” . : *Am. J. Pathol.* 164 (4): 1495-502. (2004)
- 30) Gray EG, Paula-Barbosa M, Roher A; “Alzheimer’s disease: paired helical filaments

and cytomembranes” /: Neuropathol. Appl. Neurobiol. 13 (2): 91-110. (1987)

31) Williams DR; “Tauopathies: classification and clinical update on neurodegenerative diseases associated with microtubule-associated protein tau” .: Internal medicine journal 36 (10): 652-60. (2006)

32) Mudher A, Lovestone S; “Alzheimer’s disease-do tauists and baptists finally shake hands?” .: Trends Neurosci, (2002).

33) Takeuchi, A., Irizarry, M.C., Duff, K., et al.; Age-related amyloid β deposition in transgenic mice overexpressing both Alzheimer mutant presenilin 1 and amyloid β precursor protein Swedish mutant is not associated with global neuronal loss.: Am J Pathol, 157;331-339 (2000)

34) Sperling RA, Laviolette PS, O’Keefe K, O’Brien J, Rentz DM, Pihlajamaki M, Marshall G, Hyman BT, Selkoe DJ, Hedden T, Buckner RL, Becker JA, Johnson KA.; Amyloid deposition is associated with impaired default network function in older persons without dementia.: Neuron. Jul 30;63(2):178-88. (2009)

35) Forsberg A, Engler H, Almkvist O, Blomquist G, Hagman G, et al.; PET imaging of amyloid deposition in patients with mild cognitive impairment.: Neurobiol Aging 29(10): 1456-65. (2008)

36) Weigand SD, Vemuri P, Wiste HJ, Senjem ML, Pankratz VS, Aisen PS, Weiner MW, Petersen RC, Shaw LM, Trojanowski JQ, Knopman DS, Jack CR Jr; Transforming cerebrospinal fluid A β 42 measures into calculated Pittsburgh Compound B units of brain A β amyloid. Alzheimers Dement. 7(2):133-41. (2011)

37) Suzuki, N., Cheung, T. T., Cai, X. D.; An increased percentage of long amyloid β protein secreted by familial amyloid β protein precursor (β APP717) mutants: Science, 264;1336 (1994)

38) Lilja AM, Rödner J, Mustafiz T, Thomé CM, Storelli E, Gonzalez D, Unger-Lithner C, Greig NH, Nordberg A, Marutle A.; Age-dependent neuroplasticity mechanisms in Alzheimer Tg2576 mice following modulation of brain amyloid- β levels.: PLoS One. ;8(3):e58752. (2013)

39) Tomita, T., Maruyama, K., Saido, T. C.; The presenilin 2 mutation (N141I) linked to

familial Alzheimer disease (Volga German families) increases the secretion of amyloid β protein ending at the 42nd (or 43rd) residue: *Proc Natl Acad Sci USA*, 94:2025-2030 (1997)

40) Ikeuchi T, Dolios G, Kim SH, Wang R, Sisodia SS. ; Familial Alzheimer disease-linked presenilin 1 variants enhance production of both Abeta 1-40 and Abeta 1-42 peptides that are only partially sensitive to a potent aspartyl protease transition state inhibitor of "gamma-secretase".: *J Biol Chem*. 28;278(9):7010-8. (2003)

41) Ikeda M, Yonemura K, Kakuda S, Tashiro Y, Fujita Y, Takai E, Hashimoto Y, Makioka K, Furuta N, Ishiguro K, Maruki R, Yoshida J, Miyaguchi O, Tsukie T, Kuwano R, Yamazaki T, Yamaguchi H, Amari M, Takatama M, Harigaya Y, Okamoto K. ; Cerebrospinal fluid levels of phosphorylated tau and A β 1-38/A β 1-40/A β 1-42 in Alzheimer's disease with PS1 mutations.: *Amyloid*. 20(2):107-12. (2013)

42) Pike CJ, Walencewicz AJ, Glabe CG, Cotman CW; In vitro aging of beta-amyloid protein causes peptide aggregation and neurotoxicity.: *Brain Res* 563: 311-314. (1991)

43) Lorenzo A, Yankner BA. ; Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by Congo red.: *Proc Natl Acad Sci USA* 91:12243-12247. (1994)

44) Imai T, Kosuge Y, Ishige K, Ito Y.; Amyloid beta-protein potentiates tunicamycin-induced neuronal death in organotypic hippocampal slice cultures.: *Neuroscience*. Jul 13;147(3):639-51. (2007)

45) Alobua WM, Xia W, Vohra BP. ; Axon degeneration is key component of neuronal death in amyloid- β toxicity.: *Neurochem Int*. Sep 29;63(8):782-789. (2013)

46) Lacor PN, Buniel MC, Furlow PW, Clemente AS, Velasco PT, Wood M, Viola KL, Klein WL. ; Abeta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease.: *J Neurosci*. Jan 24;27(4):796-807. (2007)

47) Jorge Parodi, Fernando J. Sepulveda, Jorge Roa, Carlos Opazo, Nibaldo C. Inestrosa,

and Luis G. Aguayo; β -Amyloid Causes Depletion of Synaptic Vesicles Leading to Neurotransmission Failure: J. Biol. Chem. 285:2506-2514. (2010)

48) Scopes DI, O'Hare E, Jeggo R, Whymant AD, Spanswick D, Kim EM, Gannon J, Amijee H, Treherne JM.; $A\beta$ oligomer toxicity inhibitor protects memory in models of synaptic toxicity. : Br J Pharmacol. Sep;167(2):383-92. (2012)

49) Yang G, Gong YD, Gong K, Jiang WL, Kwon E, Wang P, Zheng H, Zhang XF, Gan WB, Zhao NM.; Reduced synaptic vesicle density and active zone size in mice lacking amyloid precursor protein (APP) and APP-like protein 2.: Neurosci Lett. Aug 12-19;384(1-2):66-71. (2005)

50) Huang JK, Ma PL, Ji SY, Zhao XL, Tan JX, Sun XJ, Huang FD; Age-dependent alterations in the presynaptic active zone in a Drosophila model of Alzheimer's disease.: Neurobiol Dis. Mar;51:161-7. (2013)

51) Charlene Supnet, Charmiane Noonan, Kelly Richard, John Bradley, Michael Mayne; Up-regulation of the type 3 ryanodine receptor is neuroprotective in the TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease: J.Neurochem. 112, 356-365 (2010)

52) Benedicte Oules, Dolores Del Prete, Barbara Greco, Xuexin Zhang, Inger Lauritzen, Jean Sevalle, Sebastien Moreno, Patrizia Paterlini-Brechot, Mohamed Trebak, Frederic Checlet, Fabio Benfenati, Mounia Chami; Ryanodine Receptor Blockade Reduces Amyloid-Load and Memory Impairments in Tg2576 Mouse Model of Alzheimer Disease: The Journal of Neuroscience, August 22, 32(34):11820 -11834, (2012)

53) Brorson JR, Bindokas VP, Iwama T, Marcuccilli CJ, Chisholm JC, Miller RJ.; The Ca^{2+} influx induced by beta-amyloid peptide 25-35 in cultured hippocampal neurons results from network excitation.: J Neurobiol. Mar;26(3):325-38. (1995)

54) Shankar GM, Bloodgood BL, Townsend M, Walsh DM, Selkoe DJ, Sabatini BL.; Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway.: J Neurosci. Mar 14;27(11):2866-75, (2007)

55) Ivan Goussakov, Megan B. Miller, and Grace E. Stutzmann; NMDA-Mediated Ca^{2+} Influx

Drives Aberrant Ryanodine Receptor Activation in Dendrites of Young Alzheimer's Disease Mice: The Journal of Neuroscience, September 8, ,30(36):12128 -12137, (2010)

56) Wang Y, Greig NH, Yu QS, Mattson MP. ; Presenilin-1 mutation impairs cholinergic modulation of synaptic plasticity and suppresses NMDA currents in hippocampus slices. : Neurobiol Aging. Jul;30(7):1061-8. (2009)

57) Li S, Jin M, Koeglsperger T, Shepardson NE, Shankar GM, Selkoe DJ. ; Soluble A β oligomers inhibit long-term potentiation through a mechanism involving excessive activation of extrasynaptic NR2B-containing NMDA receptors. : J Neurosci. May 4;31(18):6627-38. (2011)

58) Chen Y, Behnisch T. ; The role of γ -secretase in hippocampal synaptic transmission and activity-dependent synaptic plasticity. : Neurosci Lett. Oct 25;554:16-21. (2013)

59) Fryer JD, Simmons K, Parsadanian M, Bales KR, Paul SM, Sullivan PM, Holtzman DM. ; Human apolipoprotein E4 alters the amyloid-beta 40:42 ratio and promotes the formation of cerebral amyloid angiopathy in an amyloid precursor protein transgenic model. : J Neurosci. Mar 16;25(11):2803-10. (2005)

60) Murray PS, Kirkwood CM, Gray MC, Ikonomic MD, Paljug WR, Abrahamson EE, Hentleff RA, Hamilton RL, Kofler JK, Klunk WE, Lopez OL, Penzes P, Sweet RA. ; β -Amyloid 42/40 ratio and kalirin expression in Alzheimer disease with psychosis. : Neurobiol Aging. Dec;33(12):2807-16. (2012)

61) Johnson RD, Schauerte JA, Chang CC, Wisser KC, Althaus JC, Carruthers CJ, Sutton MA, Steel DG, Gafni A. ; Single-molecule imaging reveals a β 42:a β 40 ratio-dependent oligomer growth on neuronal processes. : Biophys J. Feb 19;104(4):894-903. (2013)

62) Eun Sun Jung, Kyongman An, Hyun Seok Hong, Joung-Hun Kim, and Inhee Mook-Jung; Astrocyte-Originated ATP Protects A₁-42-Induced Impairment of Synaptic Plasticity: The Journal of Neuroscience, February 29, . 32(9):3081-3087, (2012)

63) Roselli F, Tirard M, Lu J, Hutzler P, Lamberti P, Livrea P, Morabito M, Almeida

OF.; Soluble beta-amyloid1-40 induces NMDA-dependent degradation of postsynaptic density-95 at glutamatergic synapses.: J Neurosci. Nov 30;25(48):11061-70. (2005)

64) Unger C, Hedberg MM, Mustafiz T, Svedberg MM, Nordberg A.; Early changes in Abeta levels in the brain of APPswe transgenic mice—implication on synaptic density, alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine- and N-methyl-D-aspartate receptor levels.: Mol Cell Neurosci. Oct;30(2):218-27. (2005)

65) Zhao XL, Wang WA, Tan JX, Huang JK, Zhang X, Zhang BZ, Wang YH, YangCheng HY, Zhu HL, Sun XJ, Huang FD. Expression of beta-amyloid induced age-dependent presynaptic and axonal changes in Drosophila.: J Neurosci. Jan 27;30(4):1512-22. (2010)

66) Takata K, Kitamura Y, Yanagisawa D, Morikawa S, Morita M, Inubushi T, Tsuchiya D, Chishiro S, Saeki M, Taniguchi T, Shimohama S, Tooyama I.; Microglial transplantation increases amyloid-beta clearance in Alzheimer model rats.: FEBS Lett. Feb 6;581(3):475-8. Epub 2007 Jan 16. (2007)

67) Grietje Krabbe, Annett Halle, Vitali Matyash, Jan L. Rinnenthal, Gina D. Eom, Ulrike Bernhardt, Kelly R. Miller, Stefan Prokop, Helmut Kettenmann¹, Frank L. Heppner²; Functional Impairment of Microglia Coincides with Beta-Amyloid Deposition in Mice with Alzheimer-Like Pathology: PLoS ONE 8(4): e60921, 2013

68) Ostapchenko VG, Beraldo FH, Mohammad AH, Xie YF, Hirata PH, Magalhaes AC, Lamour G, Li H, Maciejewski A, Belrose JC, Teixeira BL, Fahnstock M, Ferreira ST, Cashman NR, Hajj GN, Jackson MF, Choy WY, MacDonald JF, Martins VR, Prado VF, Prado MA.; The prion protein ligand, stress-inducible phosphoprotein 1, regulates amyloid- β oligomer toxicity.: J Neurosci. Oct 16;33(42):16552-64. (2013)

69) Streit WJ, Sammons NW, Kuhns AJ, Sparks DL; Dystrophic microglia in the aging human brain.: Glia, 5, 8—212. (2004)

70) Streit WJ; Microglial senescence; does the brain's immune system have an expiration date?: Trends Neurosci, 29: 506—510. (2006)

71) Conde JR, Streit WJ; Microglia in the aging brain.: J Neuropathol Exp Neurol 65,

199—203. (2006)

72) Ikegaya Y, Matsuura S, Ueno S, Baba A, Yamada MK, Nishiyama N, Matsuki N.; Beta-amyloid enhances glial glutamate uptake activity and attenuates synaptic efficacy. *J Biol Chem.* Aug 30;277(35):32180–6. Epub 2002 Jun 17, (2002)

73) Baba A, Mitsumori K, Yamada MK, Nishiyama N, Matsuki N, Ikegaya Y.; Beta-amyloid prevents excitotoxicity via recruitment of glial glutamate transporters.: *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* Sep;368(3):234–8. (2003)

74) Talantova M, Sanz-Blasco S, Zhang X, Xia P, Akhtar MW, Okamoto S, Dzieczapolski G, Nakamura T, Cao G, Pratt AE, Kang YJ, Tu S, Molokanova E, McKercher SR, Hires SA, Sason H, Stouffer DG, Buczynski MW, Solomon JP, Michael S, Powers ET, Kelly JW, Roberts A, Tong G, Fang-Newmeyer T, Parker J, Holland EA, Zhang D, Nakanishi N, Chen HS, Wolosker H, Wang Y, Parsons LH, Ambasudhan R, Masliah E, Heinemann SF, Piña-Crespo JC, Lipton SA.; $\alpha\beta$ induces astrocytic glutamate release, extrasynaptic NMDA receptor activation, and synaptic loss.: *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jul 2;110(27):E2518–27. (2013)

75) Rekha Bhat, Elizabeth P Crowe, Alessandro Bitto, Michelle Moh, Christos D. Katsetos, Fernando U. Garcia, Frederick Bradley Johnson, John Q. Trojanowski, Christian Sell, Claudio Torres; Astrocyte Senescence as a Component of Alzheimer's Disease: *PLoS ONE* 7(9): e45069. (2012)

76) Mallette FA, Ferbeyre G.; The DNA Damage Signaling Pathway Connects Oncogenic Stress to Cellular Senescence.: *Cell Cycle* 6: 1831– 1836, (2007)

77) Harper JW, Elledge SJ.; The DNA Damage Response: Ten Years After. *Mol Cell* 28, 739– 745, (2010)

78) Freund A, Patil CK, Campisi J.; p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype.: *EMBO J* 30, 1536–1548, (2011)

79) Liu F, Wu S, Ren H, Gu J. ;Klotho suppresses RIG-I-mediated senescence-associated

inflammation.: Nat Cell Biol 13, 254-262, (2011)

80) Benavides-Piccione R, Fernaund-Espinosa I, Robles V, Yuste R, DeFelipe J.; Age-based comparison of human dendritic spine structure using complete three-dimensional reconstructions.: Neurobiol Dis. May; 46(2):476-85. (2012)

81) von Bohlen Und Halbach O.; Structure and function of dendritic spines within the hippocampus.: Ann Anat. Dec;191(6):518-31. (2009)

82) Barnes CA; Normal aging: regionally specific changes in hippocampal synaptic transmission.; Trends Neurosci, 17, 13-18. (1994)

83) Duan H, Wearne SL, Rocher AB, Macedo A, Morrison JH, Hof PR; Age-related dendritic and spine changes in corticocortically projecting neurons in macaque monkeys.: Cereb Cortex, 13, 950-961, (2003)

84) Dickstein DL, Kabaso D, Rocher AB, Luebke JI, Wearne SL, Hof PR; Changes in the structural complexity of the aged brain.: Aging Cell, 6, 275-284. (2007)

85) Ye SM, Johnson RW; Increased interleukin-6 expression by microglia from brain of aged mice.: J Neuroimmunol, 93, 139-148. (1999)

86) Ye SM, Johnson RW; An age-related decline in interleukin-10 may contribute to the increased expression of interleukin-6 in brain of aged mice.: Neuroimmunomodulation, 9, 183-192. (2001)

87) Yirmiya R, Goshen I; Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis.: Brain Behav Immun 25, 181-213. (2011)

88) Takamori S, Rhee JS, Rosenmund C, Jahn R.; Identification of a vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons.: Nature. Sep 14; 407(6801):189-94. (2000)

89) Gras C, Herzog E, Bellenchi GC, Bernard V, Ravassard P, Pohl M, Gasnier B, Giros B, El Mestikawy S.; A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotonergic neurons.: J Neurosci. Jul 1, 22(13):5442-51. (2002)

- 90) Herzog E, Takamori S, Jahn R, Brose N, Wojcik SM.; Synaptic and vesicular co-localization of the glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in the mouse hippocampus.: J Neurochem. Nov; 99(3):1011-8. (2006)
- 91) Wojcik SM, Rhee JS, Herzog E, Sigler A, Jahn R, Takamori S, Brose N, Rosenmund C.; An essential role for vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1) in postnatal development and control of quantal size.: Proc Natl Acad Sci U S A. May 4;101(18):7158-63. (2004)
- 92) King MV, Kurian N, Qin S, Papadopoulou N, Westerink BH, Cremers TI, Epping-Jordan MP, Le Poul E, Ray DE, Fone KC, Kendall DA, Marsden CA, Sharp TV.; Lentiviral Delivery of a Vesicular Glutamate Transporter 1 (VGLUT1)-Targeting Short Hairpin RNA Vector Into the Mouse Hippocampus Impairs Cognition.: Neuropsychopharmacology. Aug 28. (2013)
- 93) Reisuke H. Takahashi, Estibaliz Capetillo-Zarate, Michael T. Lin, Teresa A. Milner, Gunnar K. Gouras; Accumulation of Intraneuronal β -Amyloid 42 Peptides Is Associated with Early Changes in Microtubule-Associated Protein 2 in Neurites and Synapses: PLoS ONE 8(1): e51965. (2013)
- 94) Libersat F, Duch C; Morphometric analysis of dendritic remodeling in an identified motoneuron during postembryonic development.: J Comp Neurol 450, 153-166. (2002)
- 95) Libersat F, Duch C; Mechanisms of dendritic maturation.: Mol Neurobiol 29, 303-320. Review. (2004)
- 96) Sheue-Houy Tyan, Ann Yu-Jung Shih, Jessica J. Walsh b, Hiroko Maruyama, Floyd Sarsoza, Lawrence Ku, Simone Eggert, Patrick R. Hof b, Edward H. Koo, Dara L. Dickstein; Amyloid precursor protein (APP) regulates synaptic structure and function: Molecular and Cellular Neuroscience 51, 43-52, (2012)
- 97) Djalali S, Höltje M, Grosse G, Rothe T, Stroh T, Grosse J, Deng DR, Hellweg R, Grantyn R, Hörtnagl H, Ahnert-Hilger G.; Effects of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on glial cells and serotonergic neurones during development.: J Neurochem.

Feb; 92 (3):616-27. (2005)

98) Yang Q, Feng B, Zhang K, Guo YY, Liu SB, Wu YM, Li XQ, Zhao MG.; Excessive astrocyte-derived neurotrophin-3 contributes to the abnormal neuronal dendritic development in a mouse model of fragile X syndrome.: PLoS Genet.; 8 (12), e1003172. (2012)

99) Christopherson KS, Ullian EM, Stokes CC, Mallowney CE, Hell JW, Agah A, Lawler J, Mosher DF, Bornstein P, Barres BA.; Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis.: Cell. Feb 11, 120 (3), 421-33 (2005)

100) Crawford DC, Jiang X, Taylor A, Mennerick S.; Astrocyte-derived thrombospondins mediate the development of hippocampal presynaptic plasticity in vitro.: J Neurosci. Sep 19, 32 (38):13100-10, (2012)

101) Harold L. Atwood, J. Martin Wojtowicz; Silent Synapses in Neural Plasticity: Current Evidence: Learn. Mem. 6, 542-571 (1999)

102) Crawford DC, Mennerick S.; Presynaptically silent synapses: dormancy and awakening of presynaptic vesicle release.: Neuroscientist. Jun, 18(3), 216-23. (2012)

103) Allen NJ, Bennett ML, Foo LC, Wang GX, Chakraborty C, Smith SJ, Barres BA.; Astrocyte glypicans 4 and 6 promote formation of excitatory synapses via GluA1 AMPA receptors.: Nature. May 27, 486(7403), 410-4. (2012)

104) Hanse E, Seth H, Riebe I.; AMPA-silent synapses in brain development and pathology.: Nat Rev Neurosci. Dec;14(12), 839-50. (2013)

105) Rosenmund C, Sigler A, Augustin I, Reim K, Brose N, et al.; Differential control of vesicle priming and short-term plasticity by Munc13 isoforms.: Neuron 33, 411-424 (2002)

106) Altrock WD, tom Dieck S, Sokolov M, Meyer AC, Sigler A; Functional inactivation of a fraction of excitatory synapses in mice deficient for the active zone protein bassoon.: Neuron 37, 787-800. (2003)

- 107) Dieck S, Sanmartín-Vila L, Langnaese K, Richter K, Kindler S; Bassoon, a novel zinc-finger CAG/glutamine-repeat protein selectively localized at the active zone of presynaptic nerve terminals.: J Cell Biol 142, 499-509. (1998)
- 108) Betz A, Thakur P, Junge HJ, Ashery U, Rhee JS; Functional interaction of the active zone proteins Munc13-1 and RIM1 in synaptic vesicle priming.: Neuron 30, 183-196. (2001)
- 109) Ohtsuka T, Takao-Rikitsu E, Inoue E, Inoue M, Takeuchi M, et al. Cast: a novel protein of the cytomatrix at the active zone of synapses that forms a ternary complex with RIM1 and munc13-1.; J Cell Biol 158, 577-590. (2002)
- 110) Silver RA, Traynelis SF, Cull-Candy SG; Rapid-time-course miniature and evoked excitatory currents at central synapses in situ.: Nature, 355, 163-6 (1992)
- 111) Matsunaga W, Isobe K, Shirokawa T.; Involvement of neurotrophic factors in aging of noradrenergic innervations in hippocampus and frontal cortex.: Neurosci Res. Apr, 54(4), 313-8. (2006)
- 112) Nagahara AH, Merrill DA, Coppola G, Tsukada S, Schroeder BE, Shaked GM, Wang L, Blesch A, Kim A, Conner JM, Rockenstein E, Chao MV, Koo EH, Geschwind D, Masliah E, Chiba AA, Tuszynski MH.; Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of Alzheimer's disease.: Nat Med. Mar, 15(3), 331-7. (2009)
- 113) Shimada A, Ohta A, Akiguchi I, Takeda T; Inbred SAMP10 as a mouse model of spontaneous, inherited brain atrophy.: J Neuropathol Exp Neurol 51: 440-450. (1992)
- 114) Shimada A, Hosokawa M, Ohta A, Akiguchi I, Takeda T; Localization of atrophy-prone areas in the aging mouse brain: Comparison between the brain atrophy model SAM-P 10 and the normal control SAM-R 1. Neuroscience , 59: 859-869. (1994)
- 115) Shimada A, Tsuzuki M, Keino H, Satoh M, Chiba Y, Saitoh Y, et al.; Apical vulnerability to dendritic retraction in prefrontal neurones of ageing SAMP10 mouse: a model of cerebral degeneration.: Neuropathol and Appl Neurobiol; 32: 1-14. (2006)

- 116) Shimada A, Keino H, Satoh M, Kishikawa M, Hosokawa M; Age-related loss of synapses in the frontal cortex of SAMP10 mouse: A model of cerebral degeneration. : Synapse 48: 198-204. (2003)
- 117) Shimada A, Ohta A, Akiguchi I, Takeda T; Age-related deterioration in conditional avoidance task in the SAMP10 mouse, an animal model of spontaneous brain atrophy. : Brain Res, 608: 266-272. (1993)
- 118) Miyamoto M; Characteristics of age-related behavioral changes in senescence-accelerated mouse SAMP8 and SAMP10. : Exp Gerontol, 32: 139-148. (1997)
- 119) Okuma Y, Murayama T, Tha KK, Yamada C, Hosokawa M, Ishikawa A, et al.; Learning deficiency and alterations in acetylcholine receptors and protein kinase C in the brain of senescence-accelerated mouse (SAM)-P10. : Mech Ageing Dev, 114: 191-199. (2000)
- 120) Onodera T, Watanabe R, Tha KK, Hayashi Y, Murayama T, Okuma Y, et al.; Depressive behavior and alterations in receptors for dopamine and 5-hydroxytryptamine in the brain of the senescence accelerated mouse (SAM)- P10. : Jpn J Pharmacol, 83: 312-318. (2000)
- 121) Shimada A, Keino H, Satoh M, Kishikawa M, Seriu N, Hosokawa M; Age-related progressive neuronal DNA damage associated with cerebral degeneration in a mouse model of accelerated senescence. : J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 57: B415-421. (2002)
- 122) Shimada A, Keino H, Kawamura N, Chiba Y, Hosokawa M; Limbic structures are prone to age-related impairments in proteasome activity and neuronal ubiquitinated inclusions in SAMP10 mouse: a model of cerebral degeneration. : Neuropathol Appl Neurobiol, 34: 33—51. (2008)
- 123) Hiroyuki Kawano, Shutaro Katsurabayashi*, Yasuhiro Kakazu, Yuta Yamashita, Natsuko Kubo, Masafumi Kubo, Hideto Okuda, Kotaro Takasakil, Kaori Kubota, Kenichi Mishima, Michihiro Fujiwara, N. Charles Harata, Katsunori Iwasaki; Long-Term Culture of Astrocytes Attenuates the Readily Releasable Pool of Synaptic Vesicles: PLoS ONE

7(10): e48034. doi:10.1371/journal.pone.0048034 (2012)

124) Sheng J. G., Mrak R. E., Rovnaghi C. R., Kozłowska E., Van Eldik L. J. , Griffin W. S. T. ; Human brain S100b and S100b mRNA expression increases with age: pathogenic implications for Alzheimer' s disease. *Neurobiol. Aging* 17, 359-63 (1996)

125) M. Pertusa, S. Garcia-Matas, E. Rodriguez-Farre, C. Sanfeliu , R. Cristofol ; Astrocytes aged *in vitro* show a decreased neuroprotective capacity, *Journal of Neurochemistry* 101, 794-805 (2007)

126) Herther H. Ross, Lindsay H. Levkoff, Gregory P. Marshall, Maria Caldeira, Dennis A. Steinder. Brent A. Reynolds, Eric D. Laywell; Bromodeoxyuridine Indices Senescence in Neural Stem and Progenitor Cells, *STEM CELLS* 26, 3218-27 (2008)

127) Jeong-Seop Rhee, Andrea Betz, Sonja Pyott, Kerstin Reim, Frederique Varoqueaux, Iris Augustin, Dorte Hesse, Thomas C. Südhof, Masami Takahashi, Christian Rosenmund, and Nils Brose; _ Phorbol Ester- and Diacylglycerol-Induced Augmentation of Transmitter Release Is Mediated by Munc13s and Not by PKCs: *Cell*, Vol. 108, 121-133, January 11 (2002)

謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究に終始御指導、御鞭撻を賜りました福岡大学薬学研究科臨床疾患薬理学教室の岩崎克典教授、ならびに藤原道弘教授に深く感謝致します。本研究の遂行にあたり終始御指導と御助言を賜りました三島健一准教授、高崎浩太郎助教、窪田香織助教に深く感謝致します。実験手技の取得のため、私の受け入れを快諾して頂いた、東京慈恵会医科大学医学研究科神経生理教室の加藤総夫教授、渡部文子准教授、高橋由香里助教に深い感謝と御礼を申し上げます。また、多大な御指導、御助言とともに、終始実験を援助してくださった桂林秀太郎助教に心より御礼申し上げます。

公私ともに御指導、御助言ならびに御協力頂いた入江圭一氏、野上愛女史に感謝の意を表します。また、共に実験して下さった井伊美由紀女史、中野佐知子女史、久保壮史氏、久保菜津子女史、奥田英人氏をはじめ臨床疾患薬理学教室の皆様に深く感謝致します。そして、学生生活を通じて始終精神的、経済的支援を賜りました家族や私を支えて下さった友人に心より感謝致します。最後に、本研究に尊い生命を提供して頂きました実験動物緒霊に深く感謝致します。